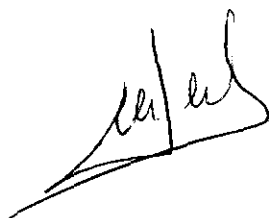


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Patología Animal II

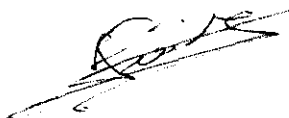
**ASPECTOS CLINICOS Y EPIZOOTIOLOGICOS
DE LA EHRLICHIOSIS CANINA. ESTUDIO
COMPARADO DE LA EFICACIA TERAPEUTICA
DE LA DOXICICLINA Y EL
DIPROPIONATO DE IMIDOCARB**



El Director del trabajo:
Dr. Miguel Angel Tesouro Díez



El Tutor del trabajo:
Dr. Fernando Rodríguez Franco



Memoria que presenta el Ldo.
Angel Sainz Rodríguez para el
acceso al grado de Doctor

Madrid, 1996

*A mis padres y mi hermano,
por su esfuerzo.
A Elia,
por su paciencia.*

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio Regional Agrario de la Comunidad Autónoma de Madrid y, en concreto, a D. Angel Asensio por colaborar en el estudio epizootiológico al cedermme, gentilmente, sueros procedentes de las campañas de vacunación.

A los Dres. D. Armino Filipe y D^a. Fátima Bacellar, del Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas de Aguas de Moura (Portugal), por su acogida en el mismo y por su ayuda en la estandarización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Y, por último, a todos los compañeros clínicos de pequeños animales que han puesto a nuestra disposición sus casos y sus historias clínicas y, en especial, a D. Manuel Lázaro y a D. Jesús Núñez-Torrón por todo lo que me han enseñado.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento:

Al director de este trabajo, Dr. D. Miguel A. Tesouro Díez, por sus consejos; de él partió la idea de comenzar a profundizar en este tema. El ha sido tan buen director como amigo.

Al Dr. D. Manuel Rodríguez Sánchez, Decano de la Facultad de Veterinaria, por el apoyo e interés mostrados durante todo el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. D^a. María Castaño, directora del Departamento de Patología Animal II, y a todos los miembros, tanto de dicho Departamento como del de Patología Animal I que, de una u otra forma, han colaborado en este trabajo, tanto en sus aspectos clínicos como laboratoriales.

Al Dr. D. Francisco Mazzucchelli, al Dr. D. Fernando Rodríguez Franco y a D^a. Inmaculada Amusategui por la ayuda prestada durante todo el trabajo y por su comprensión, sobre todo, en este último periodo de tiempo.

Al Dr. D. Miguel Tesouro Vallejo por su valiosa ayuda en la revisión bibliográfica y por saber transmitirme su espíritu investigador.

A Rhône-Mérieux S.A. y, especialmente, a D. Pere Busquets por la cesión de la línea celular DH-82, imprescindible para la puesta a punto de la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Indice

1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA	5
2.1. Historia	7
2.2. Tribu <i>Ehrlichieae</i>	9
2.3. Género <i>Ehrlichia</i>	11
2.4. Especies del género <i>Ehrlichia</i> de interés para la especie canina	12
<i>Ehrlichia platys</i>	13
<i>Ehrlichia ewingii</i>	15
<i>Ehrlichia risticii</i>	17
2.5. Especies del género <i>Ehrlichia</i> de interés para el hombre	18
<i>Ehrlichia sennetsu</i>	18
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	20
2.6. Ehrlichiosis canina	26
2.6.1. Etiología	26
2.6.2. Epizootiología	29
2.6.3. Patogenia	35
2.6.4. Sintomatología	41
2.6.5. Lesiones	45
2.6.6. Diagnóstico	49
a) diagnóstico clínico	49
b) diagnóstico laboratorial	50
c) diagnóstico diferencial	61
2.6.7. Tratamiento	62

INDICE

2.6.8. Evolución post-tratamiento y pronóstico	69
2.6.9. Profilaxis	69
2.7. Ehrlichiosis en España	72
3. MATERIALES Y METODOS	75
3.1. Plan de trabajo	77
3.2. Diagnóstico inmunológico: inmunofluorescencia indirecta	78
3.3. Estudio clínico de la ehrlichiosis canina	81
3.4. Ensayo terapéutico de la ehrlichiosis canina. Estudio biopatológico	85
3.5. Estudio epizootológico de la ehrlichiosis canina	90
4. RESULTADOS	93
4.1. Diagnóstico inmunológico	95
4.2. Estudio clínico	95
4.2.1. Concurrencia de ehrlichiosis con otros procesos patológicos	95
4.2.2. Frecuencia de presentación de los distintos síntomas observados en perros diagnosticados de ehrlichiosis canina	97
4.2.3. Asociaciones encontradas entre los diferentes grupos sintomáticos	110
4.2.4. Asociaciones entre la sintomatología y otros factores	114
4.3. Estudio biopatológico	116

4.3.1. Hematología	116
4.3.2. Bioquímica sanguínea	124
4.3.3. Urianálisis	129
4.3.4. Diagnóstico etiológico	130
4.3.5. Asociaciones entre diferentes alteraciones biopatológicas	131
4.4. Estudio terapéutico	131
4.4.1. Respuesta clínica	131
4.4.2. Evolución biopatológica post-tratamiento	133
4.5. Estudio epizootológico	143
4.5.1. Estudio descriptivo	143
4.5.2. Estudio analítico	153
5. DISCUSION	159
5.1. Estudio clínico	161
5.1.1. Concurrencia de ehrlichiosis con otros procesos patológicos	161
5.1.2. Cuadro clínico de la ehrlichiosis canina	162
5.1.3. Asociación entre la sintomatología y otros factores	171
5.2. Estudio biopatológico	174
5.2.1. Hematología	174
5.2.2. Bioquímica sanguínea	181
5.2.3. Urianálisis	185
5.2.4. Diagnóstico etiológico	187
5.3. Estudio terapéutico	188
5.3.1. Respuesta clínica	188
5.3.2. Evolución biopatológica post-tratamiento	191

INDICE

5.3.3. Resumen de la eficacia terapéutica 199

5.4. Estudio epizootiológico 201

5.4.1. Estudio descriptivo 201

5.4.2. Estudio analítico 205

6. CONCLUSIONES 209

7. RESUMEN 213

8. SUMMARY 217

9. ICONOGRAFIA 221

10. BIBLIOGRAFIA 227

1. Introducción y objetivos

A partir del año 1992, empezamos a observar en las consultas del Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de Madrid, una serie de perros con una sintomatología y/o una analítica sanguínea compatibles con ehrlichiosis canina. Algunos de estos animales presentaban concurrencia con otros procesos patológicos, como la leishmaniosis.

Esto también fue corroborado por los casos remitidos desde clínicas veterinarias usuarias del servicio de diagnóstico y control de leishmaniosis canina de nuestro departamento.

En ese momento, gracias a la puesta a punto de diferentes técnicas de laboratorio, ofertamos un apoyo al diagnóstico, tanto a las consultas de la Facultad de Veterinaria, como a los clínicos privados de pequeños animales. Desde entonces, empezamos a recibir muestras de perros sospechosos, muchos de los cuales eran positivos. Ante esta situación nos surgió la inquietud de profundizar en el conocimiento de esta enfermedad.

El amplio abanico de síntomas que observábamos en los primeros casos que diagnosticamos nos hizo centrarnos en el estudio clínico de este proceso, con el objeto de intentar definir cuál es el cuadro que acompaña a la ehrlichiosis en nuestra área geográfica.

Por otro lado, la variedad de resultados reflejados en la bibliografía en cuanto a la eficacia terapéutica de distintos protocolos empleados en la ehrlichiosis canina nos

INTRODUCCION Y OBJETIVOS

hizo planteamos la posibilidad de realizar un estudio comparativo de dos de ellos, incluyendo un tercero utilizado en la práctica por algunos clínicos privados.

Los objetivos generales que nos planteamos para la realización de este trabajo son:

- *Adaptar la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para el diagnóstico de ehrlichiosis canina.*
- *Definir el cuadro clínico y biopatológico de este proceso patológico.*
- *Valorar la eficacia terapéutica de distintos tratamientos en el curso de la ehrlichiosis canina.*
- *Conocer la situación real de la infección por *E.canis* en la Comunidad Autónoma de Madrid, valorando su seroprevalencia y analizando la existencia de diferentes factores de riesgo.*

2. Revisión bibliográfica

2.1. HISTORIA

Ehrlichia canis fue identificada por primera vez en 1935 en el Instituto Pasteur de Argelia por Donatien y Lestoquard (Donatien y Lestoquard, 1935), tras observar que algunos perros alojados en sus instalaciones e infestados por garrapatas desarrollaban ocasionalmente un proceso febril agudo que cursaba con anemia. En las extensiones sanguíneas de los perros infectados, observaron unos pequeños microorganismos en el interior de los monocitos, creyendo en un principio que podría tratarse de alguna especie de rickettsia. Estos mismos autores demostraron que no se trataba de *Rickettsia conorii*, la cual afectaba al hombre, si bien se había identificado también en perros (Donatien y Lestoquard, 1936).

Inicialmente, este microorganismo recibió el nombre de *Rickettsia canis* (Donatien y Lestoquard, 1935; Donatien y Lestoquard, 1936). Moshkovskii sustituyó en 1945 ese nombre por el actual de *Ehrlichia canis*, como reconocimiento a Paul Ehrlich, gran bacteriólogo alemán (Moshkovskii, 1945, citado por Ristic y Huxsoll, 1984).

Durante la década de los 40, se describieron casos de ehrlichiosis canina en distintos países del Centro y Sur de Africa y en la India (Ewing S.A., 1969); en 1957 esta enfermedad se detectó en Aruba (Antillas Holandesas) (Bool y Suttmöller, 1957, citado por Ewing S.A., 1969).

La primera descripción de *E. canis* en Estados Unidos se produjo en Oklahoma en 1962 (Ewing, 1963). Entonces se consideraba que la ehrlichiosis canina cursaba,

típicamente, con un cuadro leve caracterizado por fiebre, vómitos y secreción oculonasal (Ewing, 1969).

En la década de los 60, perros militares británicos sufrieron en Singapur un cuadro agudo de etiología desconocida (Wilkins et al, 1967). Poco después un proceso de características similares apareció en la población canina americana destacada en Vietnam (Huxsoll et al, 1969; Huxsoll et al, 1970a; Huxsoll et al, 1970b; Walker et al, 1970; Nims et al, 1971). La enfermedad cursó, fundamentalmente, con manifestaciones hemorrágicas graves, pancitopenia y emaciación, causando un elevado número de muertes en estas poblaciones (Walker et al, 1970; Nims et al, 1971). El proceso, debido a las dudas surgidas en cuanto a su etiología, recibió diferentes nombres, tales como rickettsiosis canina, tifus canino, fiebre hemorrágica canina, síndrome hemorrágico idiopático, enfermedad del perro de rastreo y pancitopenia tropical canina, si bien el más aceptado fue éste último (Pennisi, 1989).

A finales de los años 60 e inicios de los 70, diferentes trabajos señalaron a *E.canis* como el agente causal de la pancitopenia tropical canina (Huxsoll et al, 1969; Huxsoll et al, 1970a; Huxsoll et al, 1970b; Huxsoll et al, 1972; Seamer y Snape, 1970; Seamer y Snape, 1972). A priori no era lógico pensar que el agente etiológico de este proceso fuera *E.canis* ya que, hasta entonces, dicho organismo sólo estaba relacionado con un cuadro benigno, excepto en cachorros (Ewing, 1969).

A pesar de que la ehrlichiosis era conocida desde la década de los 30, los investigadores intensificaron su atención en ella tras la aparición de estos brotes epizooticos en perros de las fuerzas armadas y el posterior cultivo de *E.canis* (Nyindo et al, 1971; Huxsoll, 1990).

La investigación en este campo siguió un curso homogéneo hasta 1986, año en el cual se detectó, en medicina humana en Estados Unidos, una enfermedad desconocida

hasta el momento, producida por un organismo íntimamente relacionado con *E.canis* (Maeda et al, 1987). Este hecho dio un nuevo impulso a la investigación sobre esta especie y, en general, sobre las enfermedades producidas por especies del género *Ehrlichia* (Fishbein, 1990).

2.2. TRIBU *Ehrlichieae*

La tribu *Ehrlichieae* se clasifica dentro de la familia *Rickettsiaceae* y del orden *Rickettsiales* (Ristic y Huxsoll, 1984). Como ocurre con otras rickettsias, se trata de microorganismos intracelulares obligados de forma cocoide, elipsoide o pleomórfica, con un diámetro que puede ir de 0.3-0.5 a 0.8-2 micras (Weiss y Moulder, 1984).

En contraste con otras rickettsias que suelen invadir preferentemente el endotelio vascular, estos organismos tienen mayor afinidad por las células del sistema mononuclear fagocitario y, en especial, por los leucocitos circulantes (Ristic y Huxsoll, 1984).

El espectro de hospedadores para las especies de este género es muy amplio, siendo patógenas para perros, équidos, rumiantes y hombre (Ristic y Huxsoll, 1984).

Aunque existen diferencias entre unos y otros, las especies pertenecientes a esta tribu presentan tres fases, parecidas a las de las chlamydias, en su ciclo de desarrollo (Ristic y Huxsoll, 1984). En la primera de ellas tenemos los cuerpos elementales que no son más que microorganismos individuales (Ristic y Huxsoll, 1984). Estudios de microscopía electrónica han mostrado que estos cuerpos elementales se dividen por fisión binaria para formar los cuerpos iniciales (Hildebrant et al, 1973a), los cuales continúan dividiéndose para dar lugar a las mórulas, llamadas así por su aspecto típico (Hildebrant et al, 1973a; Smith y Ristic, 1977). Estas pueden incluso llegar a llenar por

completo el citoplasma, desplazando el núcleo celular y provocando la citolisis (Holland et al, 1985a).

Si bien aún no se conoce el modo en que se transmiten algunas especies de esta tribu, las garrapatas son los vectores involucrados en la transmisión de la mayoría de las enfermedades causadas por *Ehrlichieae* (Ristic y Huxsoll, 1984).

La tribu *Ehrlichieae* se divide en tres géneros (*Ehrlichia*, *Cowdria* y *Neorickettsia*) en función de las células hospedadoras por las que presentan una mayor afinidad (Ristic y Huxsoll, 1984).

Los miembros del género *Ehrlichia* invaden células mononucleares, fundamentalmente leucocitos circulantes, tanto granulocíticos como agranulocíticos (Ristic y Huxsoll, 1984)

Del segundo género, *Cowdria*, sólo se ha identificado una especie, *Cowdria ruminantum*, agente causal de la hidropericarditis infecciosa o *heartwater* (Ristic y Huxsoll, 1984). *C.ruminantum* infecta células del endotelio vascular y es transmitida por garrapatas del género *Amblyomma* (Bezuidenhout, 1987). Esta enfermedad afecta a bóvidos, ovejas y cabras, produciendo en ellos un cuadro agudo con fiebre, depresión, sialorrea y síntomas neurológicos (Uilenberg et al, 1993). Cuando se introducen animales en áreas endémicas, la enfermedad suele cursar de forma hiperaguda causando la muerte, aproximadamente, en una semana. En la analítica de los animales enfermos, destaca la existencia de leucocitosis (Du Plessis, 1970). Los hallazgos post-mortem son típicos, con presencia de hidropericardio y de transudados en cavidad torácica y abdominal (Uilenberg et al, 1993).

La investigación sobre *C.ruminantum* avanzó considerablemente tras su cultivo in vitro en 1985 (Bezuidenhout et al, 1985). Recientemente se ha evidenciado la

existencia de una muy íntima relación entre los géneros *Cowdria* y *Ehrlichia* (Vliet et al, 1992), lo que da lugar a reacciones cruzadas entre algunos de sus miembros (Du Plessis et al, 1990; Kelly et al, 1994a; Matthewman et al, 1994a).

El último género, *Neorickettsia*, también integra una sola especie, *Neorickettsia helminthoeca*. Este género se diferencia de los dos restantes en la complejidad de su ciclo biológico, incluyéndose algunas fases del mismo en un trematodo (Philip et al, 1954). Dicho trematodo actúa como vector y, al mismo tiempo, infecta determinadas especies de salmónidos que, al ser ingeridos por perros, pueden provocar la llamada intoxicación por salmón o enfermedad del salmón (Gorham y Foreyt, 1984). Este proceso cursa con una elevada mortalidad en perros no tratados. La enfermedad se caracteriza por la presencia de fiebre, anorexia, apatía, deshidratación, pérdida de peso, vómitos y diarrea. Las células de elección para este género son las del sistema mononuclear fagocitario de los tejidos linfoides.

En la década de los 60, se aisló otra especie de *Neorickettsia* que recibió el nombre de *N.elokominica*, si bien esta especie podría ser simplemente una cepa o una variedad de *N.helminthoeca* (Gorham y Foreyt, 1984).

2.3. GENERO EHRLICHIA

Dentro del género *Ehrlichia* existen diferentes especies que han sido clasificadas, en 3 grupos, en función de la similitud de las secuencias del RNA ribosómico 16S (Anderson et al, 1991):

- un grupo está formado por *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii* y *E.canis*. En 1995 se ha descrito una nueva especie aislada de ratones, *Ehrlichia muris*, que también guarda gran semejanza con las especies de este grupo (Wen et al, 1995).

- en el segundo grupo están incluidas *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila* y *Ehrlichia platys*.

E.phagocytophila infecta los leucocitos granulocíticos de bóvidos y óvidos (Tuomi y Bonsdorff, 1966); esta especie produce una infección habitualmente leve que cursa con fiebre, pérdida de peso y descenso en la producción de leche (Greig et al, 1977). *E.equi* infecta granulocitos de los équidos dando lugar a un proceso denominado ehrlichiosis equina (Gribble, 1969). Esta enfermedad suele cursar con fiebre, anorexia, depresión, edema de extremidades, ataxia, leucopenia, trombocitopenia y anemia (Gribble, 1969). *E.platys* será estudiada a continuación dentro de las especies de *Ehrlichia* que pueden infectar al perro.

- el tercer grupo está constituido por *Ehrlichia risticii* y *Ehrlichia sennetsu*, habiéndose relacionado también con *N.helminthoeca*; la clasificación de ésta última especie ha sido cuestionada recientemente, asociándose al género *Ehrlichia* por su similitud con éste (Rikihisa, 1991b; Pretzman et al, 1995).

2.4. ESPECIES DEL GENERO *Ehrlichia* DE INTERES PARA LA ESPECIE CANINA

En este género nos encontramos distintas especies con interés dentro de la patología canina. Sin lugar a dudas, es *E.canis* la que mayor importancia tiene desde un punto de vista clínico (Troy y Forrester, 1990). Este microorganismo se comporta como un parásito intracelular obligado que invade, principalmente, leucocitos de la serie agranulocítica (monocitos y linfocitos) dando lugar a un proceso patológico que recibe el nombre de ehrlichiosis canina (Ristic y Huxsoll, 1984). Este proceso será estudiado, extensamente, más adelante.

A continuación trataremos la implicación de otras especies de *Ehrlichia* en procesos patológicos que también pueden afectar a la especie canina. Entre ellas, nos referiremos a *E. platys*, *E. equi*, *E. ewingii* y *E. risticii*.

Ehrlichia platys

La infección por *E. platys* en el perro da lugar a un proceso que recibe el nombre de trombocitopenia cíclica infecciosa, descrita por vez primera en 1978 en Estados Unidos (Harvey et al, 1978). *E. platys* infecta únicamente a las plaquetas y no a los leucocitos (Rikihisa, 1991a). En extensiones de sangre teñidas con colorantes tipo Giemsa, este microorganismo aparece en forma de inclusiones basófilas en el interior de las plaquetas (Harvey et al, 1978; Hibler et al, 1986; Gaunt et al, 1990). Su forma es redonda u ovalada; ultraestructuralmente presenta doble membrana y su tamaño es de 350 a 1250 nm de diámetro. En el interior de las plaquetas infectadas, pueden aparecer de 1 a 3 vacuolas rodeadas de una membrana única, en cuyo interior podemos encontrar de 1 a 8 microorganismos (Harvey et al, 1978). Hasta el momento se han realizado diferentes intentos de cultivar esta especie de *Ehrlichia* sin éxito (Harvey, 1990).

El vector que parece estar implicado en la transmisión de *E. platys* es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Hibler et al, 1986) por lo que no resulta extraño que aparezcan concurrencias de *E. canis* y *E. platys* en un mismo perro (Hoskins et al, 1988). Sin embargo, experimentalmente los intentos de transmisión de *E. platys* por *R. sanguineus* no han obtenido resultados satisfactorios (Simpson et al, 1991)

El periodo de incubación de la enfermedad es de 8 a 15 días. En las fases iniciales de infección aparece un número elevado de plaquetas infectadas (aproximadamente el 30-60%); 3 ó 4 días después, se produce una trombocitopenia

severa (incluso con valores de 20000 a 50000 plaquetas/microlitro) (Hibler et al, 1986; Gaunt et al, 1990). Tras la desaparición del microorganismo, el recuento de plaquetas vuelve a aumentar rápidamente, alcanzando valores normales en 3 ó 4 días (Hibler et al, 1986).

La aparición de plaquetas infectadas en sangre y de una posterior trombocitopenia suele recurrir cíclicamente en intervalos de 1 a 2 semanas (Gaunt et al, 1990). La intensidad de estos ciclos suele ir reduciéndose paulatinamente observándose únicamente, con el paso del tiempo, ligeras trombocitopenias con esporádicas apariciones de *E.platys* en sangre (Gaunt et al, 1990).

Junto con la trombocitopenia, en infecciones experimentales, se ha detectado que la capacidad de agregación plaquetaria está disminuida (Gaunt et al, 1990). También se ha observado, en las fases iniciales de infección, la presencia de una ligera anemia, normocítica y normocrómica, no regenerativa (Baker et al, 1988). Además, en infecciones experimentales se han descrito otras alteraciones tales como leucopenia, hipergammaglobulinemia, hipoalbuminemia e hipocalcemia (Glaze y Gaunt, 1986; Baker et al, 1988).

Los perros infectados no suelen presentar sintomatología clínica alguna (Hibler et al, 1986; Woody y Hoskins, 1991), si bien en la fase de parasitemia inicial puede aparecer un ligero aumento de la temperatura (Harvey et al, 1978). También nos podemos encontrar, en perros con infección natural por *E.platys*, uveitis anterior bilateral (Glaze et al, 1986) y sintomatología de tipo hemorrágico (Wilson, 1992).

En infecciones experimentales, las lesiones más evidentes son linfadenomegalia, hiperplasia folicular en bazo y ganglios linfáticos e hipercelularidad en médula ósea (Baker et al, 1987).

El diagnóstico de la trombocitopenia cíclica infecciosa se puede realizar por observación directa del agente causal en plaquetas infectadas, si bien éste no es un método demasiado eficaz debido a la inconstante presencia de *E.platys* en sangre circulante (French y Harvey, 1983).

La técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos anti-*E.platys* fue desarrollada en 1983 (French y Harvey, 1983). Tras la fase inicial de parasitemia ya se alcanzan títulos de anticuerpos detectables (Baker et al, 1987), los cuales persistirán, probablemente, durante años (Woody y Hoskins, 1991). *E.platys* no presenta reacciones cruzadas con otras especies del mismo género, como *E.canis*, *E.ewingii*, *E.risticii* y *E.equi* (French y Harvey, 1983; Hoskins et al, 1988; Breitschwerdt, 1995)

Aunque la experiencia terapéutica en este proceso no es demasiado extensa, tanto la tetraciclina como la doxiciclina, a las dosis recomendadas para la infección por *E.canis*, parecen ser efectivas contra *E.platys* (Glaze y Gaunt, 1986; Wilson, 1992; Breitschwerdt, 1995).

En Grecia y Francia se ha observado un microorganismo intraplaquetario similar a *E.platys*, pero mucho más patógeno; a pesar de que aún no está totalmente caracterizado, presenta reacción cruzada con *E.platys* (Kontos et al, 1991; Beaufilet et al, 1995a).

Ehrlichia ewingii

En 1971 se describió una nueva cepa de *E.canis* que se encontraba en el interior de granulocitos, fundamentalmente en neutrófilos (Ewing et al, 1971). Algunos autores inicialmente relacionaron a este microorganismo con *E.equi*, debido a su afinidad por

este tipo de células (Madewell y Gribble, 1982). Con anterioridad se había provocado la infección experimental con *E. equi* en perros, causando en ellos un cuadro clínico leve o inaparente (Lewis et al, 1975; Winkler et al, 1988).

Posteriormente y debido a que este agente no había sido identificado claramente, recibió el nombre genérico de *Ehrlichia spp.* granulocítica, mientras que el proceso al que daba lugar se denominó ehrlichiosis granulocítica canina (Stockham et al, 1985).

Este proceso suele ser más leve que la ehrlichiosis canina clásica (Madewell y Gribble, 1982) y se ha asociado, en repetidas ocasiones, con anemia, trombocitopenia y poliartritis (Bellah et al, 1986; Carrillo y Green, 1978; Cowell et al, 1988) y, últimamente, meningitis (Maretzki et al, 1994), habiéndose detectado mórulas de *Ehrlichia spp.* en el interior de neutrófilos en líquido sinovial (Bellah et al, 1986; Cowell et al, 1988) y en líquido cefalorraquídeo (Maretzki et al, 1994).

Recientemente, el agente causal de la ehrlichiosis granulocítica ha sido identificado como una nueva especie, diferente de *E. canis*, que ha recibido el nombre de *E. ewingii* (Anderson et al, 1992b). La amplificación y la secuenciación del RNAr han mostrado que *E. ewingii* es más parecido a *E. canis* (98% de similitud) que a *E. equi* (92,4% de similitud). La existencia de reacciones cruzadas entre ellas parece guardar un cierto paralelismo con sus similitudes genéticas (Anderson et al, 1992b). Sin embargo, algunos autores consideran que la infección por *E. equi* no puede ser totalmente descartada, debido a que encuentran una gran variabilidad en la reactividad de los sueros al ser testados frente a diferentes antígenos y a la existencia de reacciones cruzadas entre *E. canis* y *E. equi* (Troy y Forrester, 1990). Además, recientemente en Suecia, a partir de perros con ehrlichiosis canina granulocítica se ha conseguido aislar una especie de *Ehrlichia* muy similar a *E. phagocytophila* y a *E. equi* (Johansson et al, 1995).

Debido a que los neutrófilos infectados por *E.ewingii* sólo pueden ser cultivados transitoriamente (Winjum y Riley, 1993), las técnicas serológicas para el diagnóstico de la infección por este agente no son empleadas rutinariamente.

A pesar de que, en la actualidad, el vector de *E.ewingii* no es conocido, se ha encontrado *Dermacentor variabilis* en perros afectados (Maretzki et al, 1994); por otro lado, *Amblyomma americanum* puede transmitir este microorganismo a perros susceptibles en condiciones experimentales (Anziani et al, 1990).

Ehrlichia risticii

E. risticii es el agente etiológico de la ehrlichiosis monocítica equina o fiebre del caballo de Potomac (Holland et al, 1985b). Aunque, inicialmente, *E. risticii* no había producido enfermedad natural en ningún otro hospedador distinto al caballo, en 1988 se demostró que los perros eran susceptibles a la infección experimental por este microorganismo (Ristic et al, 1988). No se observó ninguna sintomatología clínica pero los perros presentaban rickettsiemia y seropositividad que persistía hasta 100-200 días después de la infección. Este hallazgo hizo suponer que los perros podrían comportarse como portadores de *E. risticii*, sin padecer cuadro clínico alguno (Ristic et al, 1988).

Recientemente, más de cien casos de ehrlichiosis canina descritos en Estados Unidos, tres de los cuales fueron mortales, resultaron ser serológicamente negativos por la técnica de inmunofluorescencia indirecta frente a *E. canis* y *E. sennetsu* (Kakoma et al, 1994). Sin embargo, estos sueros reaccionaron positivamente con *E. risticii* a títulos no demasiado elevados. En tres de los casos se pudo aislar un agente morfológicamente similar a *E. risticii*. Los estudios de inmunofluorescencia indirecta y Western-blot así como el análisis por PCR y la secuenciación del gen 16S del RNAr mostraron una similitud del 100% con *E. risticii* (Kakoma et al, 1994).

La nomenclatura propuesta para dicho agente es la de *E.risticii subsp. atypicalis*, mientras que el cuadro clínico al que da lugar se ha denominado ehrlichiosis canina atípica (Kakoma et al, 1994).

Su patogenicidad parece ser similar a la de *E.canis*, puesto que, como ya hemos comentado, fue mortal para tres animales. La sintomatología asociada a este proceso es similar a la de la ehrlichiosis canina, describiéndose casos de letargia, fiebre, vómitos intermitentes, trastornos hemorrágicos, artritis y cuadros neurológicos, entre otros (Kakoma et al, 1994). Analíticamente se han observado casos de anemia, trombocitopenia y leucopenia.

Es interesante apuntar que en uno de los casos, se consiguió aislar este agente a pesar de que el animal estaba siendo tratado con tetraciclinas desde hacía tiempo (Kakoma et al, 1994).

A pesar de que no se ha conseguido identificar el vector biológico relacionado con la transmisión de *E.risticii*, las sospechas se centran en *Dermacentor variabilis* (Ristic et al, 1988). La fase adulta de esta garrapata se alimenta de varios animales domésticos, entre ellos los caballos, mientras que las larvas y ninfas lo hacen fundamentalmente de pequeños mamíferos (Ristic et al, 1988).

2.5. ESPECIES DEL GENERO *Ehrlichia* DE INTERES PARA EL HOMBRE

Ehrlichia sennetsu

E.sennetsu fue identificada por vez primera en 1953. Misao y Kobayashi consiguieron aislar un agente similar a una rickettsia a partir de sangre, ganglio linfático

y médula ósea de un paciente en Japón (Misao y Kobayashi, 1955). La sintomatología que presentaba era de fiebre, linfadenopatía, anorexia y malestar general. El aislamiento de este agente se llevó a cabo en ratón, en el que se observaron reacciones linforreticulares (Rikihisa, 1991a).

Desde entonces se han descrito nuevos casos en Japón y, recientemente, en Malasia (Ristic, 1990). Clínicamente este proceso recibió el nombre de fiebre humana de Sennetsu (en japonés, sennetsu = fiebre glandular).

En un principio se consideró que este agente patógeno podría ser una nueva especie de rickettsia y recibió, inicialmente, el nombre de *Rickettsia sennetsu*. Posteriormente se pudo observar que, tanto su ciclo de vida en el interior de monocitos como su morfología, presentaban una gran similitud con *E.canis* (Hoilien et al, 1982; Holland et al, 1985a). Además, se constató que *R.sennetsu* estaba muy relacionada antigénicamente con *E. canis* (Ristic et al, 1981). Por todo ello, *R.sennetsu* pasó al género *Ehrlichia*, recibiendo el nombre de *E.sennetsu* en 1984 (Ristic y Huxsoll, 1984).

Esta especie de *Ehrlichia* ha sido la primera que se ha podido cultivar en células Hela (Huxsoll, 1990). Estudios serológicos y de Western blot han confirmado la existencia de una íntima relación entre *E.sennetsu* y *E.canis* (Nyindo et al, 1991), aunque estudios en la secuencia del DNAr muestran a *E.sennetsu* mucho más estrechamente relacionada con *E.risticii* (Anderson et al, 1991; Shankarappa et al, 1992).

Esta enfermedad se suele presentar como un proceso febril agudo que cursa con letargia, cefaleas, mialgias y linfadenopatía, que no ha resultado fatal en ninguno de los casos descritos. Los hallazgos laboratoriales más frecuentes son leucopenia con linfocitosis, unidas a un aumento de las transaminasas séricas y de las globulinas, fundamentalmente de las alfa-2 (Rikihisa, 1991a). También se ha descrito la presencia,

en ocasiones, de anemia, trombocitopenia y de inclusiones en el interior de los monocitos (Campbell, 1994).

Aunque, en principio, debería suponerse que esta ehrlichia se transmite por garrapatas, no existe ningún dato que confirme dicha suposición. Sin embargo, un parásito de un tipo de pescado japonés podría actuar como vector en la transmisión de esta enfermedad, por lo que se ha relacionado la ingestión de este pescado crudo con la presencia de esta ehrlichiosis humana (Fukuda y Yamamoto, 1981, citado por Rikihisa, 1991a).

El tratamiento con tetraciclinas es efectivo, desapareciendo los síntomas clínicos varios días después del inicio de la terapia (Tachibana, 1986).

Ehrlichia chaffeensis

Aunque la infección por especies del género *Ehrlichia* en medicina humana se conocía en Japón desde la década de los 50, era considerada una infección poco frecuente y limitada geográficamente (Rikihisa, 1991a). Esta consideración se modificó cuando, en 1986, se diagnosticó un caso de ehrlichiosis en Estados Unidos en un paciente con garrapatas y con sospecha de fiebre manchada de las Montañas Rocosas (Maeda et al, 1987). El estudio ultraestructural de inclusiones intraleucocitarias observadas durante la fase aguda de este paciente reveló la presencia de pequeñas bacterias en el interior de vacuolas, compatibles con mórulas de ehrlichia. El suero de este enfermo durante la convalecencia mostró un descenso en 4 diluciones en el título de anticuerpos frente a *E.canis* (Maeda et al, 1987).

A partir de ese momento, entre 1985 y 1990 se han diagnosticado más de 230 casos de ehrlichiosis humana en Estados Unidos (Fishbein et al, 1994).

En un principio se consideró la posibilidad de la existencia de una nueva zoonosis (Eng y Giles, 1989) hasta que, en 1990, se consiguió aislar, a partir de un paciente enfermo en Fort Chaffee (Arkansas), una nueva especie de *Ehrlichia* que ha recibido el nombre de *E.chaffeensis* (Dawson et al, 1991a; Anderson et al, 1991). Inicialmente *E.chaffeensis* sólo se había cultivado en la línea celular DH82 (Dawson et al, 1991a). Sin embargo, recientemente se ha conseguido en diferentes líneas de uso rutinario como la Vero, HEL, HEL 299, HeLa 229 (Brouqui et al, 1994) y, también, en la BGM, L-929 y en embrión de pollo (Chen et al, 1995).

Al estudiar tanto su comportamiento serológico como la secuencia genética del ARN ribosómico 16S de esta nueva especie en comparación con otras especies de *Ehrlichia* (*E.canis*, *E.equi*, *E.phagocytophila* y *E.risticii*), se observó que el agente de la ehrlichiosis humana era muy parecido, pero no idéntico a *E.canis*; en concreto se constató que la similitud en las secuencias del 16S ARNr entre *E.chaffeensis* y *E.canis* era del 98,2% (Anderson et al, 1991; Dawson et al, 1991a).

Recientemente, se ha detectado en Estados Unidos un proceso patológico similar a la ehrlichiosis humana, apreciándose mórulas intracitoplasmáticas en las células granulocíticas (Chen et al, 1994; Bakken et al, 1994).

Tras el análisis de la secuencia de esta variedad granulocítica, se ha comprobado que su homología con *E.chaffeensis* es tan sólo del 92,5%; sin embargo presenta un alto grado de similitud con *E.phagocytophila* y *E.equi* (99,9 y 99,8% respectivamente). Con estos resultados, probablemente existe una nueva especie de *Ehrlichia* con afinidad por células granulocíticas, capaz de infectar a la especie humana (Chen et al, 1994).

Este dato cobra aún más importancia tras el reciente aislamiento de esta misma especie a partir de perros y de caballos con ehrlichiosis granulocítica en Suecia (Johansson et al, 1995).

En relación con la epidemiología, la ehrlichiosis humana parece ser una enfermedad transmitida por garrapatas. Entre el 63 y el 88 % de los pacientes han estado expuestos o infestados por ixódidos durante las 3 semanas anteriores a la aparición de la sintomatología clínica (Eng et al, 1990; Fishbein et al, 1989; Harkess et al, 1989; Petersen et al, 1989; Rohrbach et al, 1990; Fishbein et al, 1987).

Aunque se sospechó de *Rhipicephalus sanguineus*, vector para *E.canis*, como agente transmisor de esta nueva especie de *Ehrlichia*, dicha garrapata sólo infesta ocasionalmente a la especie humana (Harkess J.R., 1991). Sin embargo, la distribución de *Amblyomma americanum* en Estados Unidos coincide con la de casos de ehrlichiosis humana, por lo que se sospecha que esta garrapata podría actuar como vector de *E.chaffeensis* (Harkess J.R., 1991). Además, mediante PCR se ha detectado esta especie de *Ehrlichia* en *Amblyomma americanum* (Anderson et al, 1993).

El reservorio para la ehrlichiosis humana es desconocido. Recientemente se han detectado altas seroprevalencias frente a *E.chaffeensis* en ciervos de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en áreas en las que existe una elevada población de *A.americanum* (Dawson et al, 1994a; Lockhart et al, 1995). En condiciones experimentales, estos ciervos son susceptibles a la infección por *E.chaffeensis*, por lo que existe la posibilidad de que se comporten como reservorios en este proceso (Dawson et al, 1994b).

El contacto con perros no parece ser un factor de riesgo para la infección en el hombre (Fishbein et al, 1989; Harkess et al, 1989). Incluso existen estudios en los que perros pertenecientes a pacientes con ehrlichiosis humana no presentan evidencia serológica de infección canina reciente (Rohrbach et al, 1990). Sin embargo, otros autores indican que, en condiciones experimentales, los perros son susceptibles a la infección por *E.chaffeensis* y este microorganismo puede persistir y ser recuperado de estos animales (por cultivo de su sangre) hasta incluso 26 días después de ser inoculados

(Dawson y Ewing, 1992).

La ehrlichiosis humana tiene una presentación esporádica, si bien se han descrito brotes epidémicos en zonas concretas (Petersen et al, 1989). La mayoría de las infecciones aparecen entre primavera y otoño, con un máximo entre mayo y julio (McDade, 1990).

La incidencia real de la ehrlichiosis humana no es bien conocida, aunque diferentes estudios realizados en Estados Unidos indican que podría estar entre 3,3 y 5,3 casos por 100.000 habitantes (Fishbein et al, 1989; Harkess et al, 1989); dicha incidencia es mayor en residentes de áreas rurales (Eng et al, 1990). También se ha visto que los pacientes con ehrlichiosis suelen tener más edad que aquellos afectados por otras enfermedades transmitidas por garrapatas (Harkess et al, 1989).

La inmensa mayoría de los casos de ehrlichiosis humana han sido diagnosticados en Estados Unidos. Sin embargo, en 1991 se describió en Portugal un caso de infección por *Ehrlichia* que mostró seroconversión frente a *E.chaffeensis* (Morais et al, 1991). También se ha diagnosticado otro caso diagnosticado en Estados Unidos, pero presuntamente adquirido en Mali (Uhaa et al, 1992).

La patogenia de esta enfermedad no es bien conocida actualmente, si bien se asemeja al mejor modelo animal estudiado, la ehrlichiosis canina. Los hallazgos clínicos y laboratoriales durante la fase aguda se parecen bastante a los encontrados en la ehrlichiosis canina (Dumler y Walker, 1991). Al igual que ocurre en el perro, personas infectadas con *E.chaffeensis* pueden recuperarse espontáneamente (Dumler y Walker, 1991).

Las células diana para la infección por *E.chaffeensis* son las de la serie blanca; de hecho se pueden observar mórulas en linfocitos, monocitos y polimorfonucleares en

sangre y médula ósea (Maeda et al, 1987; Abbott et al, 1991).

Algunos autores justifican la pancitopenia que se desarrolla durante la fase aguda de la ehrlichiosis humana por el secuestro o la destrucción periférica de células sanguíneas (Harkess et al, 1989). Esta hipótesis ha sido confirmada por Dumler y colaboradores, los cuales han observado algunos casos en los que, pese a la instauración de leucopenia, trombocitopenia o pancitopenia, la médula ósea tiene una correcta funcionalidad (Dumler et al, 1993b).

Los hallazgos laboratoriales y el estudio de las lesiones indican la presencia de una infección sistémica con infiltrado perivascular de células inflamatorias. Este hallazgo se ve confirmado por la aparición de hiperplasia en médula ósea, hígado, bazo y ganglios linfáticos (Dumler et al, 1991).

El curso de la enfermedad es variable, pudiendo encontrarnos desde cuadros moderados a procesos graves; aproximadamente la mitad de los pacientes son hospitalizados (Dumler y Walker, 1991). Igualmente, la sintomatología es variada, aunque destaca la presencia de fiebre, cefalea, malestar general, mialgias y anorexia (Eng et al, 1990; Petersen et al, 1989). Suele ser frecuente la aparición de sintomatología digestiva (aproximadamente en un tercio de los pacientes) y dermatológica, encontrándose también cuadros neurológicos y respiratorios (C.D.C., 1988; Harkess et al, 1989; Eng et al, 1990; Rohrbach et al, 1990). Los pacientes pediátricos presentan, en un gran número de casos, erupciones cutáneas (Harkess et al, 1991).

Cuando la enfermedad cursa de un modo severo en adultos, suele aparecer tos, diarrea y linfadenopatía; en niños es frecuente la aparición de edema en las extremidades (Eng et al, 1990). Si el proceso continúa progresando, pueden presentarse cuadros de insuficiencia respiratoria, insuficiencia renal y alteraciones del sistema

nervioso central (Dimmitt et al, 1989; Moscovitz et al, 1991).

Los hallazgos laboratoriales más frecuentes son leucopenia, trombocitopenia y alteración de los indicadores hepáticos (Eng et al, 1990; Pearce et al, 1988); también se describe el aumento de urea y creatinina, aunque en un menor número de casos (Eng et al, 1990). La observación de médula ósea ha revelado un gran número de hallazgos entre los que destacan los siguientes: hiperplasia difusa, hipoplasia, eritrofagocitosis, plasmacitosis, megacariocitosis y normocelularidad (Taylor et al, 1988; Eng et al, 1990; Pearce et al, 1988; Harkess, 1989). En el líquido cefalorraquídeo aparece pleocitosis con un gran número de linfocitos, aumento en las proteínas totales y, ocasionalmente, mórulas de *E. chaffeensis* en el interior de células mononucleares (Dunn et al, 1992).

El diagnóstico de presunción, basado en el cuadro clínico, suele realizarse en pacientes con un cuadro febril y con antecedentes de picadura por garrapatas (Eng et al, 1990; Dumler et al, 1993b). Por tanto, el diagnóstico diferencial debe incluir, entre otras, enfermedad de Lyme, fiebre botonosa mediterránea, fiebre manchada de las Montañas Rocosas, infecciones por Orbivirus, fiebre Q, fiebre tifoidea, mononucleosis infecciosa, leptospirosis, etc (Taylor et al, 1988; Petersen et al, 1989; Guerrero, 1993).

El diagnóstico laboratorial puede realizarse por la observación de inclusiones en sangre periférica o por el cultivo del agente etiológico. Sin embargo, ambos procedimientos entrañan una gran dificultad, dando un elevado número de falsos negativos (Maeda et al, 1987; Dumler et al, 1993b).

Las técnicas de diagnóstico serológico son consideradas de preferencia desde un punto de vista clínico. Antes de conocerse la existencia de *E. chaffeensis*, se buscaba una respuesta serológica frente a *E. canis* (Dawson et al, 1990; Dawson et al, 1991b). Posteriormente se han empleado diferentes técnicas serológicas empleando como

antígeno a *E.chaffeensis*, destacando entre ellas la inmunofluorescencia indirecta (C.D.C., 1990; Dawson et al, 1991a); también se ha señalado, en este sentido, la utilidad del PCR (Anderson et al, 1992a). Actualmente, el diagnóstico inmunopatológico puede realizarse empleando anticuerpos monoclonales en tejidos de pacientes con ehrlichiosis (Yu et al, 1993).

El tratamiento de esta enfermedad está basado, fundamentalmente, en el empleo de la tetraciclina y de sus derivados. La eficacia de la doxiciclina ha quedado constatada en un gran número de casos en los que se ha empleado este fármaco (C.D.C., 1988). En ocasiones, sobre todo en pediatría, se ha empleado cloranfenicol si bien la respuesta obtenida no ha sido tan buena (Dumler et al, 1991; Maeda et al, 1987).

A pesar de que en Medicina Humana este proceso suele tener un buen pronóstico, se han descrito cuadros con evolución desfavorable que han acabado con la vida de algún paciente (Dumler et al, 1991; Dumler et al, 1993a). En este sentido, cabe destacar la descripción de un caso de ehrlichiosis seronegativa mortal en un enfermo con infección por H.I.V. (Paddock et al, 1993).

2.6.EHRLICHIOSIS CANINA

2.6.1. ETIOLOGIA

El agente etiológico de la ehrlichiosis canina es *E.canis*, especie perteneciente al género *Ehrlichia*, tribu *Ehrlichieae*, familia *Rickettsiaceae*, orden *Rickettsiales*. Todos los miembros de la tribu *Ehrlichieae*, en líneas generales, son cocos Gram - (Ristic y Huxsoll, 1984).

E.canis es un organismo de forma cocoide o elipsoide, aunque en cultivos

celulares puede adoptar formas pleomórficas; se encuentra en fagosomas en el interior del citoplasma de monocitos y linfocitos (Nyindo et al, 1971; Ristic y Huxsoll, 1984; Rikihisa, 1991a). Con tinciones tipo Romanowski, estos cuerpos intracitoplasmáticos adquieren una tonalidad basófila (Ristic y Huxsoll, 1984).

Tras el estudio del ciclo vital in vitro, se pudo demostrar que este microorganismo se desarrolla a partir de cuerpos elementales aislados que tienen un diámetro aproximado de entre 0,5 y 0,9 micras (Nyindo et al, 1971; Ristic y Huxsoll, 1984; Weiss et al, 1989). Estos cuerpos elementales están rodeados por una doble membrana: la externa (o pared celular) de aspecto rugoso y la membrana plasmática interna (Simpson, 1972; Hildebrant et al, 1973a). La entrada del microorganismo en el interior de la célula parece llevarse a cabo por endocitosis mediada por receptores proteicos existentes en la superficie celular (Messick y Rikihisa, 1993).

En las células infectadas no se produce la fusión fagolisosómica y los cuerpos elementales aumentan de tamaño y se dividen en el interior del fagosoma (Wells y Rikihisa, 1988). La replicación se produce por fisión binaria; a los 3-5 días post-infección, aparece un pequeño número de cuerpos elementales agrupados; estas formaciones se observan como inclusiones pleomórficas con un tamaño aproximado de 0,4 a 2 micras y reciben el nombre de cuerpos iniciales (Nyindo et al, 1971). Durante los 7-12 días siguientes continúa el crecimiento y replicación de estos organismos dando lugar a las mórulas, denominadas así por su forma típica (Nyindo et al, 1971; Simpson, 1972; Hildebrant et al, 1973). Estas se encuentran rodeadas por una membrana que engloba un número variable de cuerpos elementales (incluso hasta 40) (Weiss y Dasch, 1981).

Las distintas formas de *E. canis* no se distribuyen homogéneamente por todo el citoplasma, sino que ocupan preferentemente uno de los polos citoplasmáticos (Rikihisa, 1991a).

La liberación de los microorganismos de la célula hospedadora es debida, por un lado, a la lisis celular, y por otro, a fenómenos de exocitosis como consecuencia de la fusión de la membrana del fagosoma con la membrana citoplasmática celular (Rikihisa, 1991a). La destrucción de las células hospedadoras parece que tiene lugar cuando el citoplasma celular se encuentra repleto de microorganismos.

El ciclo de infección completo, desde la invasión de la célula hospedadora hasta la salida de ella, se completa en 12-18 días (Weiss y Dasch, 1981).

En macrófagos infectados por otras especies de *Ehrlichia*, concretamente por *E. risticii*, se ha observado una supresión en la expresión de un antígeno en su superficie, paso necesario para el reconocimiento de dichas células por los linfocitos T; este mecanismo puede ser empleado por las especies de este género para intentar asegurar su supervivencia frente a la respuesta inmunitaria del hospedador (Messick y Rikihisa, 1992).

A pesar de que el metabolismo de *E. canis* no es tan bien conocido como el de otras especies de *Ehrlichia* [en concreto *E. risticii* y *E. sennetsu* (Weiss et al, 1985; Weiss et al, 1988)], cada vez se conocen más detalles acerca de sus actividades metabólicas. Las especies del género *Ehrlichia* no son capaces de utilizar en su metabolismo la glucosa. El sustrato más utilizado es la glutamina, en lugar del glutamato (Weiss et al, 1990); este hecho se ha constatado debido a la producción de ATP por microorganismos de este género en presencia de glutamina (Weiss et al, 1989). La principal diferencia en el metabolismo de estas dos moléculas reside en que el glutamato es una molécula muy cargada, lo cual dificulta su transporte a algunas células (Weiss et al, 1990). Por el contrario, la glutamina es transportada más fácilmente, siendo desaminada con rapidez a glutamato y catabolizada siguiendo el ciclo del ácido cítrico (Weiss et al, 1988). El bajo nivel de catabolismo de glutamato es, de algún modo, sustituido por glutamina exógena (Weiss et al, 1990).

Los estudios iniciales sobre *E.canis* se centraron en la enfermedad y en su transmisión, sin prestar demasiada atención a las propiedades biológicas del agente causal. Sin duda alguna, esta falta de progresión en la investigación fue debida inicialmente a los ineficaces métodos para el mantenimiento y multiplicación in vitro de *E.canis* (Huxsoll, 1990).

El cultivo de este microorganismo se llevó a cabo, al principio, a partir de monocitos de sangre periférica obtenida de perros experimentalmente infectados durante la fase aguda de la enfermedad (Nyindo et al, 1971). Este protocolo de cultivo in vitro fue modificado posteriormente, transfiriendo células infectadas por *E.canis* a cultivos primarios de monocitos caninos obtenidos de perros no infectados (Hemelt et al, 1980). También se logró cultivar esta rickettsia en macrófagos peritoneales caninos (Stephenson y Osterman, 1977).

Posteriormente, se ha conseguido su cultivo en diferentes líneas celulares continuas. Así, se ha descrito el cultivo de *E.canis* en una línea celular, producto de la hibridación entre macrófagos peritoneales caninos y fibroblastos humanos modificados (Stephenson y Osterman, 1980). También se ha reproducido el cultivo en la MDH-SP, línea celular híbrida entre monocitos caninos y macrófagos peritoneales de ratón (Holland y Ristic, 1991). Poco después, se ha cultivado en la DH82, línea continua canina frecuentemente utilizada, de tipo macrofágico obtenida a partir de un caso de histiocitosis maligna canina (Dawson et al, 1991a) y, recientemente, en una línea celular endotelial humana denominada CDC/EU.HMEC-1 (Dawson et al, 1993).

2.6.2. EPIZOOTIOLOGIA

ESPECIES SENSIBLES

E.canis presenta, como la mayoría de las especies de este género, una gran

especificidad de hospedador. No solamente el perro es sensible a la infección por *E.canis*, sino que diferentes especies de cánidos salvajes pueden ser hospedadores de este microorganismo.

Experimentalmente, el coyote (*Canis latrans*) (Ewing et al, 1964), el zorro rojo (*Vulpes vulpes*) y gris (*Urocyon cinereoargenteus*) (Amyx y Huxsoll, 1973), el licaón (*Lycaon pictus*) y el chacal de dorso negro (*Canis mesomelas*)(Van Heerden e Immelman, 1979; Pyle, 1980) han sido infectados por la inoculación de sangre infectada con *E.canis*. En estos animales la enfermedad se presenta de un modo benigno.

También se han descrito infecciones naturales en lobos (*Canis lupus*) y en cruces de perro con lobo (Harvey et al,1979) y en chacales de dorso plateado (*Canis aureus*)(Price y Karstad, 1980). Además, se ha conseguido transmitir la infección de zorros a perros por inoculación de su sangre y a través de *R.sanguineus* (Amyx y Huxsoll, 1973). Este hecho deberá hacernos tener en cuenta aún más la implicación de estas especies salvajes en la transmisión de la ehrlichiosis canina.

A pesar de que los primeros estudios mostraban la posible sensibilidad a la infección experimental en algunos primates (en concreto *Macacus inuus*) (Donatien y Lestoquard, 1937), posteriormente diferentes investigadores han fracasado en el intento de conseguir dicha infección (Groves et al, 1975; Van Heerden y Goosen, 1981).

Además, se ha intentado sin éxito provocar la infección en condiciones experimentales en conejo, ratón, rata, hamster, cobaya y gato (Ewing, 1969).

No obstante, en 1986 se describió por vez primera un caso de posible ehrlichiosis en el gato (Charpentier y Groulade, 1986). Más adelante, en Kenia, Francia y Estados Unidos se detectaron nuevos casos de infección natural en gatos que presentaban una sintomatología compatible con ehrlichiosis (Buoro et al, 1989; Bouloy

et al, 1994; Beaufile et al, 1995b). El cuadro clínico descrito incluye anorexia, fiebre, apatía, esplenomegalia, linfadenopatía generalizada, anemia e hiperglobulinemia (Buoro et al, 1989; Bouloy et al, 1994).

Estos animales respondieron al tratamiento con tetraciclinas o con imidocarb (Charpentier y Groulade, 1986; Buoro et al, 1989; Bouloy et al, 1994).

Si bien los vectores de este proceso aún no se conocen, en algunos gatos afectados se han detectado garrapatas, en concreto *Haemaphysalis leachi* (Buoro et al, 1989).

Aunque no se ha logrado aislar el agente causal en estos casos, se han detectado anticuerpos frente a *E.canis* y *E.risticii*, pero parece que la infección en el gato es producida por una nueva especie cercana a *E.canis* (Bouloy et al, 1994).

VECTORES

E.canis es transmitida a los cánidos por *R.sanguineus* (Groves et al, 1975; Smith et al, 1976). *R.sanguineus* es, probablemente, la especie de garrapatas más ampliamente distribuida en el mundo: Norte, Centro y Sudamérica, Africa, Madagascar, China, Australia, Sur de Europa(incluido España), etc (Cordero del Campillo, 1980; Hoskins, 1991).

En áreas tropicales y subtropicales se puede encontrar esta garrapata durante todo el año. En zonas de clima mediterráneo, su presencia se extiende desde el principio de la primavera hasta el otoño, aunque, dependiendo de la climatología, algunas garrapatas pueden encontrarse en los perros durante el invierno (Hoskins, 1991). La mayoría de los ejemplares de *R.sanguineus* son activos durante la primavera,

con un ligero descenso en la población durante el verano, para apreciarse un segundo incremento durante el otoño (Estrada, 1994).

En Estados Unidos esta garrapata infecta, casi exclusivamente, a perros pero se puede encontrar en caballos, rumiantes y personas que conviven estrechamente con los perros (Cupp, 1991). En otras áreas del mundo, *R.sanguineus* se ha encontrado, también, en otros mamíferos (búfalos, camellos, gatos, vacas, ciervos, cabras, ovejas, leones, cebras, liebres, erizos), reptiles y aves de gran tamaño como la avestruz y el águila ratonera (Hoskins y Cupp, 1983). Esta inusual adaptación a tan amplio rango de hospedadores es casi única dentro de las garrapatas ixódidas (Hoskins, 1991).

En el perro las garrapatas adultas se encuentran fundamentalmente en las orejas, a lo largo de la nuca y entre los dedos de las patas. Las larvas y las ninfas normalmente están localizadas en las áreas de pelo largo del cuello. En infestaciones masivas, todos los estadios de la garrapata pueden encontrarse en la mayoría de las regiones del cuerpo (Hoskins, 1991).

R.sanguineus es una garrapata de 3 hospedadores, en cuyo ciclo de vida podemos destacar los siguientes datos (Hoskins, 1991):

- la hembra pone alrededor de 4000 huevos.
- el periodo de preoviposición es de 3 a 83 días.
- el periodo de incubación es de 8 a 67 días.
- las larvas se alimentan en 3-7 días y mudan en 6-23 días; sin alimentarse pueden sobrevivir más de 253 días.
- las ninfas se alimentan en 4-9 días y mudan en 12-129 días; sin alimentarse pueden sobrevivir más de 183 días.
- las hembras adultas se alimentan en 6-50 días; sin alimentarse pueden sobrevivir más de 568 días.

En condiciones favorables el ciclo de vida de *R.sanguineus* puede completarse incluso en 63 días, por lo que en zonas cálidas es frecuente que varias generaciones de garrapatas pueden darse en el mismo año (Hoskins, 1991).

TRANSMISION

En cuanto a la transmisión de *E.canis* del perro a la garrapata, ocurre más fácilmente durante las primeras 2 ó 3 semanas de infección ya que los leucocitos infectados son más prevalentes, en la sangre del perro, en estas fases iniciales (Hibler et al, 1986).

En las garrapatas, *E.canis* se multiplica en el interior de los hemocitos y de las células de las glándulas salivares; también pueden entrar en la pared del tracto digestivo, concretamente en el epitelio del intestino medio (Smith et al, 1976). Ocasionalmente las células epiteliales intestinales pueden desprenderse a la luz del aparato digestivo.

En otra especie diferente de garrapata, concretamente en *Dermacentor andersoni*, se ha considerado la regurgitación de los contenidos intestinales durante la alimentación como un hecho a tener en cuenta en la transmisión de las enfermedades en las que actúa como vector (Gregson, 1967). Por el contrario, en el caso de *R.sanguineus*, la regurgitación de células epiteliales no parece tener trascendencia alguna en ese sentido (Smith et al, 1976).

Algunas ehrlichias son eliminadas por las heces y pueden aparecer libres en el medio ambiente (Smith et al, 1976). Sin embargo, existe un vacío de conocimiento en cuanto a su susceptibilidad o resistencia a diferentes factores ambientales ya que hasta ahora no se ha conseguido el crecimiento de *E.canis* en el exterior de células vivas

(Smith et al, 1976).

La principal fuente de infección para el perro son las secreciones de las glándulas salivares contaminadas con *E.canis* (Smith et al, 1976). En el momento en que se alimenta *R.sanguineus*, contamina la zona con dichas secreciones. La atracción de leucocitos al lugar de la picadura debido a la inflamación (Theis y Budwiser, 1974) y las propias secreciones de la garrapata podrían facilitar la infección de las células mononucleares (Rikihisa, 1991a).

Las primeras referencias sobre *E.canis* indicaban que tanto la transmisión transestadial como la transovárica, tenían lugar en *R.sanguineus* (Donatien y Lestoquard, 1937). Sin embargo, estudios posteriores no consiguieron detectar esta rickettsia en el ovario de la garrapata, demostrando que la transmisión era únicamente transestadial (Groves et al, 1975; Smith et al, 1976).

Cualquier fase del ciclo de desarrollo de la garrapata (larva, ninfa o adulto), puede transmitir esta enfermedad; tanto los machos como las hembras son capaces de hacerlo (Groves et al, 1975; Smith et al, 1976). Un adulto de garrapata puede transmitir *E.canis* y, por tanto, causar ehrlichiosis canina al menos durante 155 días después de haberse infectado (Lewis et al, 1977). Con este periodo de infectividad tan largo, existe la posibilidad de que garrapatas infectadas en otoño sobrevivan durante el invierno, pudiendo ser capaces de transmitir la enfermedad a perros en la primavera siguiente (Lewis et al, 1977). De esta manera y a pesar de que no se produzca la transmisión transovárica de *E.canis*, la garrapata podría actuar como reservorio de la transmisión de esta enfermedad (Lewis et al, 1977). En este sentido, es interesante recordar que las garrapatas adultas pueden sobrevivir sin alimentarse incluso hasta 568 días, lo cual indica su gran potencial no sólo como vector sino también como reservorio (Woody y Hoskins, 1991)

Perros sin sintomatología clínica pueden mantener infecciones crónicas inaparentes durante incluso más de 5 años (Groves et al, 1975), lo cual tiene gran importancia desde un punto de vista epizootiológico. *E.canis* puede persistir durante largos periodos de tiempo en la sangre de perros que han pasado una fase aguda de la enfermedad. Por este motivo, la transfusión de sangre de estos animales provocará la infección activa de perros receptores susceptibles (Ristic et al, 1972; Groves et al, 1975). Este hecho explica que diferentes autores consideren al perro, y no tanto a la garrapata, como el reservorio natural de *E.canis* (Groves et al, 1975; Huxsoll, 1975; Rikihisa, 1991a).

2.6.3. PATOGENIA

La infección en el perro tiene lugar cuando la garrapata se alimenta de su sangre. En condiciones experimentales el periodo de incubación de la ehrlichiosis canina es de 9 a 14 días (Ewing y Buckner, 1965b); sin embargo, en otros estudios sobre infección natural y experimental se indica que dicho periodo puede comprender de 8 a 20 días (Hibler et al, 1986). Tras este periodo de incubación, se describen clásicamente tres fases de la enfermedad: aguda, subclínica y crónica (Huxsoll et al, 1970b; Buhles et al, 1974).

Fase aguda

Tras la entrada y replicación de *E.canis* en el interior de las células mononucleares, se produce su diseminación por la circulación sanguínea o linfática, hecho que coincide con la fase aguda de la enfermedad y que suele durar de 2 a 4 semanas (Huxsoll et al, 1970b; Buhles et al, 1974). De este modo, las ehrlichias pueden alcanzar las células del sistema mononuclear fagocitario del hígado, bazo y ganglios

linfáticos, provocando en ellos una hiperplasia linforreticular que da lugar a un aumento en su tamaño (Reardon y Pierce, 1981). La diseminación de *E. canis* continúa por otros órganos afectando, fundamentalmente, a pulmón, riñones y meninges. En estos órganos, las células infectadas actúan sobre el endotelio, dando lugar a vasculitis; al mismo tiempo se produce una infiltración de estas células infectadas hacia los tejidos perivasculares, provocando importantes procesos inflamatorios en esas zonas (Hibler et al, 1986, Troy y Forrester, 1990). Estos mecanismos patogénicos podrían ayudar a la instauración de una coagulación intravascular diseminada (Reardon y Pierce, 1981; Troy y Forrester, 1990).

Desde un punto de vista biopatológico, destaca la presentación de una pancitopenia transitoria (Huxsoll et al, 1970b; McDade, 1990).

La trombocitopenia aparece por un descenso en la vida media de las plaquetas, más que por un descenso en su producción (Smith et al, 1975; Pierce et al, 1977; Reardon y Pierce, 1981). Estudios realizados marcando radiactivamente estas células indican que el 50% desaparecen de la sangre en tan solo 12 horas (Smith et al, 1974). Diferentes procesos inmunomediados e inflamatorios pueden motivar el secuestro, consumo y destrucción prematura de las plaquetas en el bazo, dando lugar a un acortamiento de su vida media (Pierce et al, 1977; Kakoma et al, 1977; Lovering et al, 1980). También se relaciona la existencia de trombocitopenia con el consumo de plaquetas, secundario a la instauración de una vasculitis inducida por *E. canis* (Pierce et al, 1977; Lovering et al, 1980).

Además, pueden presentarse alteraciones en la funcionalidad plaquetaria, fundamentalmente en cuanto a su migración en sangre, la cual parece estar inhibida por alguna sustancia sérica, ausente en animales sanos y asociada a la infección por *E. canis* (Kakoma et al, 1978). Dicha sustancia ha recibido el nombre de factor de inhibición de la migración plaquetaria (PMIF) y sería producida por los linfocitos B. Este factor es

capaz de impedir la formación de pseudópodos en las plaquetas y de inducir cambios en su superficie haciéndolas, así, más susceptibles a la destrucción por células del sistema mononuclear fagocitario (Kakoma et al, 1978; Wilkins et al, 1973; Kakoma et al, 1980; Van Heerden, 1982).

En cualquier caso, en esta fase aguda la trombopoyesis funciona correctamente, observándose en sangre circulante un aumento en el porcentaje de megatrombocitos (Pierce et al, 1977).

La serie roja se ve igualmente afectada, presentándose anemia causada fundamentalmente por la destrucción acelerada de eritrocitos (Buhles et al, 1974; Reardon y Pierce, 1981). En este periodo, la anemia normalmente es regenerativa (Woody y Hoskins, 1991) ya que la médula ósea suele ser hiper celular (Buhles et al, 1975).

El recuento de leucocitos en sangre es variable; inicialmente encontraremos una ligera leucopenia (Buhles et al, 1974; Reardon y Pierce, 1981) debida al secuestro de leucocitos motivado por procesos inmunológicos e inflamatorios (Ristic, 1976). Esta leucopenia puede transformarse posteriormente en leucocitosis (Hibler et al, 1986).

La función de los leucocitos también puede verse alterada; así, los linfocitos de perros con ehrlichiosis pueden producir un factor con efecto citotóxico sobre monocitos autólogos (Kakoma et al, 1977). Esta sustancia podría ser similar a la que inhibe la formación de pseudópodos plaquetarios (Kakoma et al, 1977). Además, se ha aislado otro factor inhibidor de la migración leucocitaria, específico de especie, en perros con ehrlichiosis (Nyindo et al, 1980) lo que, unido a la existencia de otros factores aún no conocidos completamente, podría contribuir a explicar la elevada frecuencia con la que aparecen casos de concurrencia de ehrlichiosis con otros procesos (Greene, 1995).

Las primeras referencias ya indicaban la relativa frecuencia con que se presentan infecciones mixtas de ehrlichiosis y babesiosis canina (Donatien y Lestoquard, 1937; Bool y Suttmöller, 1957; Ewing y Buckner, 1965a). Tanto los signos clínicos como las alteraciones laboratoriales, en estos casos, son similares a los que aparecen en infecciones simples (Winkler et al, 1988; Klag et al, 1991; Matthewman et al, 1993).

Además, se han descrito concurrencias con hepatozoonosis (Bool y Suttmöller, 1957; Gossett et al, 1985; Elias y Homans, 1988; Beaufile y Legroux, 1992), hemobartonelosis (Bool y Suttmöller, 1957), leishmaniosis (Schaer et al, 1985; Winkler et al, 1988; Tesouro et al, 1993) y también con enfermedad de Lyme (Moreland et al, 1990).

En animales infectados por otras especies de *Ehrlichia*, en concreto por *E.phagocytophila*, se ha podido justificar la existencia de concurrencias debido a la presencia de un estado de inmunosupresión, con una disminución en la producción de anticuerpos frente a otros procesos (Larsen et al, 1994).

Fase subclínica

La fase subclínica aparece, en condiciones experimentales, de 6 a 9 semanas tras la infección; su duración es de 1 a 4 meses (Huxsoll et al, 1970b; Amyx et al, 1971; Huxsoll et al, 1972; Buhles et al, 1974). Sin embargo, en infecciones naturales este periodo puede alargarse incluso por encima de 5 años (Codner y Farris-Smith, 1986).

En perros infectados experimentalmente, la anemia, trombocitopenia y leucopenia que aparecen en la fase aguda van gradualmente desapareciendo hasta alcanzar recuentos normales en la fase subclínica (Buhles et al, 1974); por el contrario, en infecciones naturales frecuentemente persisten estas alteraciones hematológicas

(Codner y Farris-Smith, 1986). Por tanto, esta fase viene definida por la ausencia de sintomatología clínica en perros con presencia de alteraciones hematológicas (Codner y Farris-Smith, 1986).

Debido a la persistencia de la infección, se produce una exacerbada respuesta inmunitaria de tipo humoral, dando lugar a un aumento en la producción de anticuerpos (Greene y Harvey, 1984; Ghorbel et al, 1993b). Algunos autores señalan que la efectividad de la respuesta inmunitaria frente a *E.canis* depende de la interacción de dicho microorganismo con factores tanto humorales como celulares (Lewis et al, 1978; Lewis y Ristic, 1978), aunque los anticuerpos realmente no confieren protección en este proceso (Amyx et al, 1971; Buhles et al, 1974; Weisiger et al, 1975).

Si el animal es inmunocompetente, puede superar la infección en este periodo (Greene y Harvey, 1984; Hibler et al, 1986); si es incapaz de eliminar las ehrlichias, continuará infectado evolucionando en un mayor o menor espacio de tiempo hacia la fase crónica (Buhles et al, 1974; Greene y Harvey, 1984).

Fase crónica

Su gravedad depende de diferentes factores, tales como la virulencia de la cepa de *E.canis*, el estado inmunitario del hospedador, su edad, raza, la existencia de infecciones concurrentes y el estrés (Nyndo et al, 1980; Greene y Harvey, 1984).

Experimentalmente se ha descrito la predisposición de la raza Pastor Alemán, en comparación con el Beagle, a la instauración de una fase crónica severa, a los 2-3 meses post-infección (Huxsoll et al, 1970b; Buhles et al, 1974).

Estudios posteriores han mostrado que el Pastor Alemán infectado por *E.canis*

presenta una menor respuesta inmunitaria de tipo celular que el Beagle (Nyindo et al, 1980). Sin embargo, los estudios basados en la experiencia clínica indican que, en principio, no existe una relación directa entre la raza y la gravedad del proceso en la fase crónica (Troy et al, 1980; Kuehn y Gaunt, 1985; Codner y Farris-Smith, 1986).

Parece ser que la existencia de una situación de estrés o de inmunosupresión (como puede ser una cirugía) es capaz de desencadenar un cuadro clínico después de una prolongada fase subclínica (Codner y Farris-Smith, 1986). La cronicidad de este proceso dará lugar a una importante respuesta inmunitaria que, en principio, provocará una linfocitosis (Weiser et al, 1991) e hiperproteinemia debido a una exacerbada producción de anticuerpos (Burghen et al, 1971; Troy et al, 1980; Kuehn y Gaunt, 1985; Weiser et al, 1991). La persistencia de *E.canis* dentro de las células puede producir reacciones de hipersensibilidad y respuestas inmunomediadas, que provocarán una gran variedad de síntomas clínicos (Huxsoll et al, 1972; Reardon y Pierce, 1981).

La gravedad de esta fase se ha venido asociando tanto con la trombocitopenia (Smith et al, 1974; Codner y Farris-Smith, 1986) como con el grado de aplasia medular (Hildebrant et al, 1973b; Buhles et al, 1974; Smith et al, 1974).

La médula ósea suele estar afectada, presentando inicialmente una hipoplasia eritroide que da lugar a una anemia no regenerativa (Hildebrant et al, 1973b; Buhles et al, 1974; Makinde y Bobade, 1994). La relación medular mieloide/eritroide suele estar aumentada, siendo típica la presencia de plasmocitosis debida a una estimulación antigénica crónica (Weisiger et al, 1975, Kuehn y Gaunt, 1985).

A medida que el proceso se va haciendo más grave, la médula se irá afectando en todas sus líneas celulares, pudiéndose producir incluso una aplasia medular completa que determinará la presencia de un cuadro severo con pancitopenia que suele desembocar en la muerte del perro (Buhles et al, 1974).

En ocasiones, pese a la existencia de una celularidad medular normal o incluso aumentada, inexplicablemente pueden aparecer citopenias periféricas (Waddle y Littman, 1988). Este fenómeno podría explicarse por la existencia de mielodisplasias; esta patología medular vendría motivada por una carencia en folatos y vitamina B₁₂, debido a un excesivo consumo de ambos durante la fase subclínica de la enfermedad (Capelli et al, 1994).

2.6.4. SINTOMATOLOGIA

La ehrlichiosis canina, como hemos comentado, puede presentarse en su forma aguda, subclínica y crónica.

Fase aguda

Aparece tras el periodo de incubación y suele durar, como ya hemos señalado, de 2 a 4 semanas. Los signos clínicos son bastante inespecíficos: fiebre, apatía y decaimiento, anorexia, pérdida de peso y, en ocasiones, linfadenomegalia, esplenomegalia (Huxsoll et al, 1972; Greene y Harvey, 1984; Troy et al, 1980; Kuehn y Gaunt, 1985; Greene et al, 1985; Breitschwerdt et al, 1987; Waddle y Littman, 1988) y edema en extremidades o en escroto (Huxsoll et al, 1972; Woody y Hoskins, 1991; Breitschwerdt, 1995). La presencia de garrapatas no es un signo constante en esta fase; de hecho sólomente en un 40 % de estos animales se han observado garrapatas (Troy et al, 1980; Greene et al, 1985).

También, ocasionalmente, pueden presentarse síntomas hemorrágicos, si bien éstos son más frecuentes durante la fase crónica de la enfermedad. Incluso en perros con acusada trombocitopenia, sólo excepcionalmente aparecen cuadros de este tipo

(Troy y Forrester, 1990).

Además, se ha descrito la presentación de sintomatología respiratoria debida a la existencia de procesos inflamatorios y hemorrágicos: exudado oculonasal, disnea, cianosis y, a veces, aumento de la intensidad de los sonidos respiratorios (Huxsoll et al, 1970b; Huxsoll et al, 1972; Codner et al, 1985). Radiológicamente estos animales pueden presentar radiopacidades intersticiales difusas en pulmón (Codner et al, 1985).

En infecciones experimentales se ha encontrado uveitis; sin embargo, la aparición de síntomas oculares es mucho más frecuente en la fase crónica de la enfermedad (Gelatt, 1991).

Todas estas manifestaciones clínicas, en algunos animales, pueden remitir espontáneamente sin tratamiento (Troy y Forrester; 1990).

Fase subclínica

Durante esta fase únicamente aparecen alteraciones biopatológicas. Los animales normalmente no tienen fiebre y recuperan el peso perdido, no presentando sintomatología clínica alguna (Woody y Hoskins, 1991).

Fase crónica

Aproximadamente la mitad de los perros presentan cuadros hemorrágicos, tales como petequias y equimosis en piel y mucosas, epistaxis, melena y hematomas en los lugares de punción venosa. También se describe la presentación de hemorragias

internas, hematuria, hipema, hemorragia retiniana, hemoptisis, hematemesis, hemartrosis y hemorragia cerebral (Troy et al, 1980; Kuehn y Gaunt, 1985; Waddle y Littman, 1988; Woody y Hoskins, 1991). La presencia de hemorragias en el miocardio puede producir síntomas cardíacos como taquicardia o diferentes arritmias que pueden acompañarse de una intensa disnea (Hibler et al, 1986; Woody y Hoskins, 1991). Si la hemorragia o la anemia son severas, el animal puede presentar una marcada hipotensión que puede desencadenar un cuadro de shock (Greene y Harvey, 1984). De todos estos síntomas hemorrágicos, el más frecuente es la epistaxis, unilateral o bilateral (Walker et al, 1970; Huxsoll et al, 1970b; Perille y Matus, 1991; Woody y Hoskins, 1991).

En aquellos casos en los que la enfermedad, en su fase crónica, no cursa de un modo severo, aparecen síntomas inespecíficos similares a los descritos en la fase aguda: anorexia, fiebre, decaimiento, pérdida de peso, distensión abdominal y palidez de mucosas (Troy et al, 1980; Hribernik, 1981; Hibler et al, 1986; Gilbert et al, 1992). También puede aparecer, con cierta frecuencia, edema de extremidades o de escroto (Huxsoll, 1975; French, 1988; Bonnard y Dralez, 1990; Woody y Hoskins, 1991). La ictericia no suele observarse en perros con ehrlichiosis, excepto cuando existe una infección concurrente por *Babesia canis* (Ewing y Buckner, 1965).

Los síntomas respiratorios en esta fase se deben a la existencia de un proceso pulmonar que afecta a los capilares intersticiales; normalmente podemos observar un exudado nasal mucopurulento acompañado, a veces, de disnea y tos, resultado de una neumonía intersticial (Huxsoll et al, 1970b; Reardon y Pierce, 1981; Greene y Harvey, 1984; Codner et al, 1985; Kuehn y Gaunt, 1985). La frecuencia de presentación de este proceso es elevada por lo que algunos autores recomiendan, como apoyo al diagnóstico, la realización de un estudio radiológico de tórax, que nos puede mostrar desde un ligero patrón lineal a nivel pulmonar hasta un marcado infiltrado intersticial con opacidades peribronquiales (Codner et al, 1985).

En relación con el sistema nervioso, se han detectado distintos procesos como ataxia, síndromes de neurona motora superior e inferior, hiperestesia generalizada o localizada e incluso se ha llegado a asociar con síndromes convulsivos (Troy et al, 1980; Greene y Harvey, 1984; Hibbler et al, 1986; Andreasen, 1988; Meinkoth et al, 1989). También se han observado síndromes vestibulares centrales y periféricos (Greene et al, 1985). Estas patologías se relacionan con meningoencefalitis por la presencia de infiltrados de células plasmáticas o de hemorragias en las meninges (Woody y Hoskins, 1991).

Además, la ehrlichiosis canina se ha relacionado con diferentes patologías oculares, tales como fotofobia, conjuntivitis, petequias en conjuntiva, opacidad corneal, uveitis anterior o panuveitis e hipema (Troy et al, 1980; Swanson, 1982, citado por Glaze y Gaunt, 1986). También puede aparecer retinitis difusa, desprendimiento de retina, hemorragia subretiniana, papiledema y neuritis óptica (Ellett et al, 1973; Hoskins et al, 1983). De todos ellos, el proceso más típico y que más habitualmente se manifiesta es la uveitis anterior (Swanson et al, 1982, citado por Glaze y Gaunt, 1986). Todos estas alteraciones pueden presentarse tanto en la fase aguda como en la crónica, si bien es en esta última en la que se presentan con mayor frecuencia (Davidson, 1989; citado por Gelatt, 1991). Pese a ello, el estudio histológico de los ojos de perros infectados experimentalmente sólo revela, durante la fase crónica, focos aislados de células plasmáticas, neutrófilos y macrófagos cargados de pigmento en el tracto uveal (Ellett et al, 1973).

También se ha asociado la infección por *E.canis* a la presencia de polimiositis (Buoro et al, 1990) y a cuadros de poliartritis o monoartritis que producen cojeras o debilidad en las extremidades (Bellah et al, 1986; Madigan, 1987; Cowell et al, 1988). Sin embargo, la sintomatología articular suele ser mucho más frecuente en infecciones por *E.ewingii* (Anderson et al, 1992b).

En fases crónicas la funcionalidad renal puede estar afectada dando lugar a la presentación de poliuria, polidipsia, anorexia, vómitos e incluso úlceras en la cavidad oral (Woody y Hoskins, 1991). Si aparece una glomerulopatía inmunomediada, el animal desarrollará una insuficiencia renal que normalmente no responde al tratamiento (Troy et al, 1980; Codner y Maslin, 1992).

El aparato reproductor femenino también puede afectarse, presentándose hemorragias vaginales post-parto, infertilidad, abortos, mortalidad neonatal y hemorragias prolongadas en el proestro (Woody y Hoskins, 1991).

Aunque hasta hace poco la única sintomatología relacionada con la piel era de tipo hemorrágico (petequias, equimosis, etc), recientemente se han descrito síntomas cutáneos en la fase crónica de esta enfermedad (Sagredo et al, 1994). Debido a la persistencia de *E.canis* durante prolongados periodos de tiempo, en esta fase se producen reacciones de hipersensibilidad (Huxsoll et al, 1977; Reardon y Pierce, 1981) que pueden tener su reflejo a nivel cutáneo (Sagredo et al, 1994).

2.6.5. LESIONES

Las lesiones encontradas en la ehrlichiosis canina dependen de la fase de infección y de la gravedad del proceso (Troy y Forrester, 1990). Es típica la presencia de hemorragias (petequias y equimosis) en las mucosas y serosas de la mayoría de los órganos como pulmones, riñones, vejiga, cavidad nasal, estómago, intestino delgado y grueso, corazón, ojos, testículos y tejido subcutáneo (Ewing, 1969; Hildebrant et al, 1973b; Troy et al, 1980). En los casos de ehrlichiosis crónica severa sufrida por perros de las fuerzas armadas estadounidenses en el sudeste de Asia, las hemorragias afectaron fundamentalmente a corazón, pulmón, tracto digestivo y sistema urogenital (Hildebrant et al, 1973b). Los órganos más afectados macroscópicamente suelen ser los pulmones,

bazo e hígado ; éste último suele ser más pálido y de consistencia más friable (Reardon y Pierce, 1981).

La linfadenopatía generalizada junto a la hepatomegalia y la esplenomegalia son lesiones características, siendo más frecuentes en la fase aguda (Greene y Harvey, 1984). Todos los ganglios, incluyendo los mesentéricos, pueden estar aumentados de tamaño y ligeramente decolorados (Hildebrant et al, 1973b).

La médula ósea, en la fase aguda, toma una coloración rojiza debido a su hiper celularidad (Reardon y Pierce, 1981), siendo hipoplásica y pálida en la fase crónica (Hibler et al, 1986).

En casos crónicos se puede apreciar un estado de emaciación con un deterioro evidente de la condición corporal; también puede aparecer edema de tejido subcutáneo en zonas declives del cuerpo (Bonnard y Dralez, 1990).

En líneas generales, el hallazgo histológico más característico es la plasmocitosis en tejidos linfopoyéticos y la presencia de un infiltrado perivascular de células plasmáticas y, en menor medida, de linfocitos en diferentes órganos como pulmones, cerebro, meninges, riñones, ganglios linfáticos y bazo y, con menos frecuencia, en tercer párpado, retina, vejiga y testículos (Huxsoll et al, 1970b; Hildebrant et al, 1973b; Reardon y Pierce, 1981).

En los ganglios y en el bazo aparece plasmocitosis e hiperplasia reticuloendotelial produciéndose, en ambos órganos, unas lesiones similares y paralelas en el tiempo (Reardon y Pierce, 1981; Troy y Forrester, 1990). En las fases iniciales de la infección se produce una hiperplasia linforreticular, tanto en las áreas paracorticales de los ganglios linfáticos como en la pulpa roja esplénica (Ewing, 1969; Reardon y Pierce, 1981).

Según avanza la enfermedad, la concentración de células plasmáticas en los ganglios linfáticos aumenta desde la corteza hasta los cordones medulares externos, donde casi acaban siendo la única población celular (Hildebrant et al, 1973). Los folículos linfoides van proliferando hacia los tejidos circundantes, siendo sustituidos los linfocitos pequeños por células plasmáticas y linfocitos grandes (Reardon y Pierce, 1981; Troy y Forrester, 1990).

La esplenomegalia de la ehrlichiosis aguda está causada por la proliferación de células linforreticulares en la pulpa blanca y de células reticuloendoteliales en la pulpa roja (Reardon y Pierce, 1981), existiendo, para algunos autores, un componente congestivo (Troy y Forrester, 1990). La actividad y el tamaño de los centros germinales aumenta inicialmente para ir disminuyendo posteriormente (Ewing, 1969; Reardon y Pierce, 1981; Troy y Forrester, 1990). La población de células plasmáticas esplénicas es variable pero suele ser mayor en fases crónicas (Hildebrant et al, 1973b; Troy y Forrester, 1990).

A pesar de que menos de una tercera parte de los casos presentan signos neurológicos (Greene, 1986), la existencia de un infiltrado linfoplasmocitario perivascular en las meninges se detecta en un porcentaje elevado de perros con ehrlichiosis (Hildebrant et al, 1973b). Cuando el curso de la enfermedad ha sido breve, este infiltrado presenta una distribución difusa ocupando la totalidad de las meninges; por el contrario, en fases crónicas se suele limitar a pequeños acúmulos focales alrededor del endotelio vascular (Hildebrant et al, 1973b). Algunos perros presentan una meningoencefalitis no supurativa, frecuentemente multifocal que afecta, preferentemente, al tronco del encéfalo, mesencéfalo y corteza cerebral (Hildebrant et al, 1973b; Troy y Forrester, 1990). Ocasionalmente se pueden ver afectadas las meninges cerebelares, observándose una ligera encefalitis en el cerebelo. También, a veces, próximos a la unión entre la sustancia gris y la sustancia blanca de la corteza cerebral, se han encontrado acúmulos de polimorfonucleares que sugerirían la posible

presencia de émbolos sépticos (Hildebrant et al, 1973b). Estos émbolos sépticos también se han descrito en otros órganos, concretamente en pulmones y glomérulo renal, pudiendo ser reflejo de un cuadro de septicemia terminal debida a una extrema leucopenia (Hildebrant et al, 1973b).

A nivel respiratorio, la lesión típica es la neumonía intersticial (Ewing, 1969; Hildebrant et al, 1973b; Codner et al, 1985; Reardon y Pierce, 1981). Se observan hemorragias intersticiales y alveolares y acúmulo de células plasmáticas en las áreas perivascular y peribronquial (Codner y Woody, 1986; referido por Woody y Hoskins, 1991). En la fase crónica aparece un engrosamiento de la pared septal alveolar debido a una hipertrofia e hiperplasia de sus células. Junto al acúmulo de células plasmáticas alrededor de los vasos pulmonares, se describe el aumento en el número de células reticuloendoteliales inmaduras presentes en el tejido intersticial (Ewing, 1969; Hildebrant et al, 1973b). De cara al diagnóstico destaca la posibilidad de observar diferentes formas de *E.canis* en macrófagos del endotelio pulmonar y en células mononucleares septales (Ewing, 1969; Hildebrant et al, 1973b; Troy y Forrester, 1990).

En cuanto al riñón, se puede presentar vasculitis con infiltrado de células plasmáticas alrededor de los vasos en la unión corticomedular, zona en la que también pueden existir focos hemorrágicos (Reardon y Pierce, 1981). Algunos autores han observado diferentes lesiones a nivel glomerular (Huxsoll et al, 1970b; Hildebrant et al, 1973b; Troy et al, 1980) en perros con ehrlichiosis canina. Estas lesiones, concretamente la amiloidosis glomerular y la glomerulonefritis inmunomediada, podrían deberse a la estimulación antigénica crónica producida por *E.canis* (Codner et al, 1992). Sin embargo, en infecciones agudas experimentales las lesiones glomerulares detectadas se han restringido únicamente a la fusión de los podocitos, no observándose signos claros de glomerulonefritis inmunomediada (Codner et al, 1992). En estudios de inmunopatología, se han podido detectar depósitos de inmunoglobulinas en el glomérulo

y en el mesangio (Codner et al, 1992).

En el hígado se produce una necrosis centrolobular debida a la deficiente circulación y a la presión causada por la hiperplasia reticuloendotelial multifocal que aparece en la fase aguda (Reardon y Pierce, 1981); también hay dilatación de los sinusoides centrolobulares y, a veces, acúmulo de células plasmáticas alrededor de las venas centrolobulares y de las triadas portales (Ewing, 1969; Hildebrant et al, 1973b).

La ehrlichiosis canina no se suele diagnosticar definitivamente en la necropsia, debido a la dificultad con la que se identifica el agente causal en tejidos fijados con formol o solución de Bouin (Ewing, 1969; Troy y Forrester, 1990). Las mórulas son raramente observadas en células mononucleares de tejidos teñidos con hematoxilina-eosina. (Hildebrant et al, 1973b; Troy y Forrester, 1990)

2.6.6. DIAGNOSTICO

Existen diferentes aspectos que pueden ser de utilidad a la hora de llegar a un diagnóstico de infección por *E.canis*.

A) DIAGNOSTICO CLINICO

Las enfermedades producidas por especies del género *Ehrlichia*, a menudo, son difíciles de diagnosticar. Por un lado, muchos de los signos clínicos asociados normalmente a la ehrlichiosis canina, tales como depresión, letargia, pérdida de peso o anorexia, son inespecíficos; por otro, los síntomas que se describen como los más típicos (hemorragias, fiebre, linfadenomegalia e infestación por garrapatas) no siempre aparecen (Woody y Hoskins, 1991). Según algunos autores, menos de la mitad de los perros con ehrlichiosis presentan sintomatología hemorrágica (Troy y Forrester, 1990).

Por este motivo, los hallazgos clínicos deben valorarse conjuntamente con los resultados de la hematología, la bioquímica y la serología, para poder emitir un diagnóstico de ehrlichiosis (Woody y Hoskins, 1991).

B) DIAGNOSTICO LABORATORIAL

B.1) Diagnóstico laboratorial inespecífico: hematología y bioquímica

La trombocitopenia es el hallazgo más frecuente en perros con ehrlichiosis canina, apareciendo a los 15-20 días post-infección y pudiendo persistir durante todas las fases de la enfermedad (Troy et al, 1980; Greene et al, 1985; Kuehn y Gaunt, 1985; Codner y Farris-Smith, 1986; Breitschwerdt et al, 1987; Waddle y Littman, 1988; Davoust et al, 1991). Sin embargo, el mecanismo causal de la trombocitopenia varía dependiendo de la fase, como ya se ha comentado en la patogenia de la enfermedad.

No obstante, existen casos de ehrlichiosis sin trombocitopenia. Para algunos autores, probablemente se ha sobreestimado en la literatura la incidencia de trombocitopenia, puesto que el recuento plaquetario se ha utilizado, a veces, como parámetro previo a la realización de una técnica más específica para el diagnóstico de esta enfermedad (Woody y Hoskins, 1991).

El recuento plaquetario no siempre se correlaciona con la gravedad de las hemorragias describiéndose, en ocasiones, importantes variaciones diarias en este parámetro analítico (Troy et al, 1980). Algunos perros con recuentos de plaquetas inferiores a $10,000/\text{mm}^3$ no presentan hemorragias mientras que, otros con recuentos plaquetarios normales, pueden tener síntomas de este tipo debido a alteraciones en la funcionalidad plaquetaria (Kuehn y Gaunt, 1985; Codner et al, 1985; Woody y Hoskins, 1991; Perille y Matus, 1991).

También la anemia es un hallazgo frecuente en el curso de la ehrlichiosis canina (Troy et al, 1980; Greene et al, 1985; Kuehn y Gaunt, 1985; Codner y Farris-Smith, 1986; Breitschwerdt et al, 1987; Waddle y Littman, 1988); durante la fase aguda, será regenerativa debido al aumento de la destrucción de los hematíes por mecanismos inmunológicos (Reardon y Pierce, 1981). Un elevado número de perros con anemia regenerativa serán positivos al test de Coombs, lo cual debe ser tenido en cuenta para no incurrir en errores diagnósticos (Heald, 1984; Greene et al, 1985). Estos resultados sugieren la existencia de una unión inespecífica de inmunoglobulinas a los eritrocitos o de un proceso autoinmune específico por la existencia de anticuerpos frente a la superficie eritrocitaria, lo cual podría contribuir a la instauración de un cuadro hemolítico agudo en algunos perros con ehrlichiosis (Heald, 1984; Breitschwerdt, 1995).

Posteriormente, en fases crónicas, la anemia será no regenerativa debido a la destrucción continuada de eritrocitos, la pérdida crónica de sangre y la existencia de hipoplasia o aplasia medular (Woody y Hoskins, 1991). En casos de infección concurrente con *Babesia canis* o tras una hemorragia reciente, la anemia puede adquirir un cierto carácter regenerativo (Troy y Forrester, 1990).

El recuento leucocitario es uno de los parámetros más variables en la ehrlichiosis canina, como ya ha sido señalado. Una ligera leucopenia aparece en la fase aguda debido a mecanismos inmunológicos. Posteriormente esta leucopenia se transformará en leucocitosis (Hibler et al, 1986). Durante la fase crónica, es frecuente la aparición de leucopenia debida a la hipoplasia o aplasia medular (Buhles et al, 1974). Algunos autores también han encontrado, en relación con la serie blanca, neutropenia, linfocitosis y monocitosis (Codner y Farris-Smith, 1986; Troy y Forrester, 1990). Además se ha señalado la presencia, en la fase crónica, de linfocitos con granulación azurófila debido a la estimulación constante del sistema inmunitario (Weiser et al, 1991). Otros autores describen la presentación de linfopenia y eosinopenia, asociándolas

al uso previo de corticosteroides (Breitschwerdt et al, 1987).

En algunos casos se han encontrado células anormales o indiferenciadas en sangre circulante, pudiendo confundirse con aquellas que aparecen en alteraciones mieloproliferativas (Madigan, 1987).

Los hallazgos en médula ósea varían en función de la fase y la gravedad de la infección (Hibler et al, 1986), a excepción de la plasmocitosis que suele observarse con mucha frecuencia (Troy et al, 1980; Breitschwerdt et al, 1987). Durante las fases aguda y subclínica se produce una hiper celularidad de las series megacariocítica y mieloide (Hibler et al, 1986). Algunos autores describen la existencia de hipoplasia eritroide en este periodo (Woody y Hoskins, 1991).

En la fase crónica la médula ósea es hipoplásica, afectando a todas las líneas celulares y provocando, por tanto, la típica pancitopenia (Troy et al, 1980; Kuehn y Gaunt, 1985; Waddle y Littman, 1988). Sin embargo, ocasionalmente se ha observado normocelularidad e hiper celularidad medular con megacariocitosis (Kuehn y Gaunt, 1985; Waddle y Littman, 1988) y aumento en el número de mastocitos (Kuehn y Gaunt, 1985).

En cuanto a la bioquímica sanguínea, debido al estímulo antigénico, la hiperproteinemia motivada por una hiperglobulinemia es un hallazgo frecuente en perros con ehrlichiosis (Burghen et al, 1971; Buhles et al, 1974; Weisiger et al, 1975; Troy et al, 1980; Codner et al, 1985; Greene et al, 1985; Kuehn y Gaunt, 1985; Codner y Farris-Smith, 1986; Breitschwerdt et al, 1987; Davoust et al, 1991b; Weiser et al, 1991). Los niveles séricos de globulinas aumentan progresivamente en el curso de la enfermedad y adquieren unos valores elevados de la primera a la tercera semana post-infección (Burghen et al, 1971; Buhles et al, 1974; Greene y Harvey, 1984).

En infecciones experimentales, a las 2 semanas se produce un transitorio aumento de la fracción alfa-2 globulina, que recupera sus valores normales en el mes siguiente (Burghen et al, 1971). En estas condiciones, en fase crónica, se detectan aumentos de las gamma-globulinas y descenso en la concentración de albúmina; la fracción beta-globulina también puede presentar valores elevados (Buhles et al, 1974; Davoust et al, 1991b).

La magnitud de la hiperglobulinemia no suele estar directamente relacionada con la cantidad de anticuerpos producidos frente a *E.canis*, sino con la duración de la infección (Burghen et al, 1971; Ristic et al, 1972; Weisiger et al, 1975). De hecho, la hiperglobulinemia puede ser indicativa de una respuesta inmunitaria exacerbada e inefectiva (Buhles et al, 1974; Hoskins et al, 1983; Greene y Harvey, 1984; Woody y Hoskins, 1991). Por este motivo y a causa de la persistencia del agente infeccioso en el organismo, podrían producirse autoanticuerpos que explicarían la existencia de anticuerpos antinucleares en algunos perros con ehrlichiosis (Greene y Harvey, 1984). Sin embargo, recientemente se ha descartado la presencia de estos anticuerpos antinucleares en perros con ehrlichiosis canina (Kelly et al, 1994b). En animales con trombocitopenia en fase aguda, el complemento se puede fijar sobre plaquetas dañadas (Lovering et al, 1980), por lo que pueden aparecer en sangre anticuerpos antiplaquetarios (Greene y Harvey, 1984).

Durante la fase crónica, el estudio electroforético de las proteínas séricas suele mostrar la existencia de una gammapatía policlonal, con aumento de las fracciones alfa-2, beta y gamma globulinas (Harvey et al, 1979; Kuehn y Gaunt, 1985; Ghorbel et al, 1993). Con menos frecuencia se han detectado gammapatías monoclonales, por aumento de IgG (Hoskins et al, 1983; Codner y Farris-Smith, 1986; Breitschwerdt et al, 1987; Matus et al, 1987). En cualquier caso, tras el tratamiento, los niveles de globulinas se suelen normalizar entre los 3 y 9 meses post-tratamiento, aunque a veces es necesario esperar incluso más de 18 meses (Greene y Harvey, 1984; Perille y Matus, 1991;

Greene, 1995).

La hipoalbuminemia se presenta durante la fase aguda y, normalmente, desaparece en la subclínica, describiéndose también en las fases crónicas (Burghen et al, 1971; Harvey et al, 1979; Davoust et al, 1991a). La hipoalbuminemia puede deberse a su empleo en procesos inflamatorios, pérdida de peso, proteinuria, malnutrición, hepatopatía concurrente, pérdida de proteínas a nivel periférico debido a la existencia de edemas y compensación debida a la hiperglobulinemia (Hibler et al, 1986; Baker et al, 1988; Woody y Hoskins, 1991). No obstante, la existencia de una relación inversamente proporcional entre la cantidad de proteína perdida en la orina y la concentración sérica de albúmina, en perros infectados experimentalmente, ha hecho que la proteinuria sea el factor al que mayor importancia se le conceda en este sentido (Codner y Maslin, 1992).

Los parámetros laboratoriales indicadores tanto de la funcionalidad hepática como de la renal suelen presentar valores normales en perros con ehrlichiosis (Greene, 1995). Sin embargo, se han descrito aumentos de la ALT (GPT) y de la fosfatasa alcalina, fundamentalmente en fase aguda; estos pueden también acompañarse de hiperbilirrubinemia (Troy y Forrester, 1990). En estos casos, con la instauración de una terapia apropiada, estos valores suelen disminuir hasta niveles fisiológicos, excepto en aquellos animales en los que como consecuencia de la ehrlichiosis se ha producido una lesión hepática o renal irreversible (Woody y Hoskins, 1991).

En caso de presentar problemas hemorrágicos, el tiempo de hemorragia y el de retracción del coágulo suelen estar prolongados por la existencia de trombocitopenia o de trombocitopatía (Hribenik, 1981; Kuehn y Gaunt, 1985; Hibler et al, 1986). Sin embargo, el tiempo de protrombina, el tiempo de tromboplastina parcial activada y los productos de degradación del fibrinógeno suelen ser normales (Kuehn y Gaunt, 1985), excepto en el caso de que se haya instaurado un cuadro de coagulación intravascular

diseminada (Hibler et al, 1986).

Los aumentos en la urea y la creatinina por encima de los valores fisiológicos de referencia pueden tener un origen prerrenal (deshidratación) o renal. Así, se presentan casos de uremia asociados a glomerulonefritis y a plasmocitosis intersticial renal (Troy et al, 1980; Breitschwerdt et al, 1987).

En un alto porcentaje de perros con ehrlichiosis se ha encontrado proteinuria y hematuria, con o sin uremia (Troy et al, 1980), relacionándose con la existencia de lesiones glomerulares inmunomediadas (Troy y Forrester, 1990; Breitschwerdt, 1995). Este hecho también se ha observado, en infecciones experimentales, durante la fase aguda, detectándose una pérdida máxima de proteínas a las 3-4 semanas post-infección debida a una nefropatía motivada por la existencia de lesiones ultraestructurales a nivel glomerular (Codner y Maslin, 1992). Al igual que ocurre con la hipoalbuminemia, la proteinuria también desaparece durante la fase subclínica.

En perros con gammapatía monoclonal también se puede detectar proteinuria; el perfil electroforético de las proteínas de la orina presenta, en este caso, un paralelismo con las séricas, apareciendo un claro aumento de las IgG (Breitschwerdt et al, 1987).

El análisis del líquido cefalorraquídeo de perros con sintomatología neurológica muestra elevados niveles de proteínas y pleocitosis mononuclear con gran número de linfocitos y células plasmáticas (Greene et al, 1985).

El líquido sinovial, en casos con artritis, suele presentar una coloración amarillenta con aumento de la concentración de proteínas y del recuento celular, con predominancia de neutrófilos maduros (75%) y con algunos macrófagos y linfocitos. Las típicas mórulas pueden visualizarse tanto en líquido sinovial como en

cefalorraquídeo.

B.2) Diagnóstico laboratorial específico

B.2.1.) Examen microscópico: diagnóstico etiológico

Las mórulas o inclusiones intracelulares de *E.canis* pueden detectarse en el citoplasma de monocitos y de linfocitos en sangre circulante (Carter et al, 1971; Nyindo et al, 1971; Pennisi; 1989; Elias, 1991). Algunos autores identifican estas mórulas más fácilmente en monocitos que en linfocitos (Carter et al, 1971; Pyle, 1980), mientras que otros las detectan en mayor número en linfocitos (Ewing et al, 1971). Estas formas de *E.canis* aparecen con mayor frecuencia en la fase aguda, si bien lo hacen de un modo transitorio y en pequeño número por lo que, a menudo, pasan desapercibidas (Troy et al, 1980; Hibler et al, 1986; Du Plessis et al, 1990). La probabilidad de encontrarlas aumenta, especialmente en perros leucopénicos, si previamente se realiza una leucoconcentración con la muestra sanguínea y se observa una extensión de la capa de glóbulos blancos (Ewing, 1969; Hibler et al, 1986; Beaufile et al, 1995a). Esto también sucede si se realiza una fina extensión de sangre periférica, realizando una pequeña incisión en la oreja (Ewing, 1969; Greene y Harvey, 1984; Hibler et al, 1986). Algunos autores señalan una mayor presencia de células infectadas en el borde de la extensión (Troy y Forrester, 1990).

Con tinciones tipo Giemsa las inclusiones intracitoplasmáticas se observan de color violáceo oscuro aunque, en ocasiones, pueden adquirir una tonalidad rosa-azulada (Nyindo et al, 1971; Carter et al, 1971; Elias, 1991; Woody y Hoskins, 1991); con tinciones de Wright se observan de color violáceo o rojizo (Woody y Hoskins, 1991).

Estos cuerpos de inclusión también se pueden observar en aspirados e improntas

de médula ósea, ganglio linfático, bazo y pulmón (Ewing, 1969; Carter et al, 1971; Pierce et al, 1977; Reardon y Pierce, 1981). Muy raramente se verán leucocitos infectados en las secreciones nasales y oculares (Ewing, 1969).

Debido a la dificultad de observación y a su baja frecuencia de presentación, el hecho de que en estas muestras no se detecten los cuerpos de inclusión no implica que el animal no padezca este proceso. La sensibilidad de este diagnóstico es baja puesto que el total de células mononucleares infectadas suele ser inferior al 1 %, disminuyendo aún más este porcentaje a medida que evoluciona la enfermedad (Cowell et al, 1988; French, 1988; Gilbert et al, 1992).

Las inclusiones desaparecen de los leucocitos aproximadamente a los 10-14 días después del comienzo del tratamiento (Winkler et al, 1988; Elias, 1991).

El diagnóstico etiológico puede confirmarse con el cultivo de *Ehrlichia* spp a partir de monocitos caninos, si bien esta técnica es complicada y no suele emplearse rutinariamente (Nyindo et al, 1971). También se puede realizar una inmunofluorescencia directa sobre muestras de sangre o de diferentes tejidos con el fin de asegurar el diagnóstico (Carter et al, 1971).

B.2.2.) Diagnóstico inmunológico

Debido a la inespecificidad de los signos clínicos y a la dificultad para identificar *E.canis* en sangre, el diagnóstico de ehrlichiosis normalmente se basa en los resultados de diferentes técnicas inmunológicas. De todas ellas, la más empleada tanto en medicina veterinaria como en medicina humana es la inmunofluorescencia indirecta (IFI), empleando como antígeno cultivos celulares infectados (Dawson et al, 1991b). En concreto esta técnica presenta, para el diagnóstico de *E.canis*, una alta sensibilidad y

especificidad (Ristic et al, 1972).

En relación con su especificidad, se ha comprobado la ausencia de reacciones cruzadas con un gran número de agentes no rickettsiales (como *Leptospira canicola*, *Brucella canis*, *herpesvirus* canino y virus de *parainfluenza*), *N.helminthoeca* (Ristic et al, 1972), *Borrelia burgdorferi* (Magnarelli y Anderson, 1993) y diferentes especies del género *Rickettsia* (*R.tsutsugamushi*, *R.canada*, *R.burnettii*, *R.mooseri*, *R.akari*) (Ristic et al, 1972). Tampoco es importante la ligera reacción cruzada que a veces se produce con *R.rickettsii*, agente causal de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas (Greene et al, 1985).

Se ha señalado la existencia de reacciones cruzadas entre diferentes especies del género *Ehrlichia*, aunque los títulos son mayores para el agente que realmente está causando la infección (Woody y Hoskins, 1991). Sin embargo, es importante señalar la ausencia de reacción cruzada entre *E.canis* y *E.platys* (Greene y Harvey, 1984) y entre *E.canis*, *E.equi* y *E.risticii* (Ristic et al, 1986). Tan sólo es de destacar la fuerte reacción cruzada con *E.sennetsu* (Ristic et al, 1981), con *E.chaffeensis* (Anderson et al, 1991; Dawson et al, 1991b), con *C.ruminantium* (Du Plessis et al, 1990; Kelly et al, 1994a; Matthewman et al, 1994a) y más ligeramente con *N.helminthoeca* (Rikihisa, 1991b).

Con esta técnica detectamos anticuerpos en el suero a los 7 días post-infección, concretamente IgA e IgM, si bien las IgG, a veces no aparecen hasta los 28 días (Ristic et al, 1972; Buhles et al, 1974). Todos los perros suelen ser seropositivos a los 20 días, alcanzando un máximo en el título de anticuerpos a los 80 días después de la infección (Buhles et al, 1974; Maeda et al, 1987). Este título persistirá elevado mientras la infección perdure (Ristic et al, 1972; Buhles et al, 1974; Weisiger et al, 1975), excepto en algunos casos graves, en los que, justo antes de la muerte, pueden aparecer descensos súbitos en el título e incluso títulos negativos (Buhles et al, 1974; Weisiger

et al, 1975; Greene y Harvey, 1984).

Tras la eliminación de *E.canis*, bien por la instauración de un tratamiento o bien por una respuesta inmunitaria efectiva del perro, los títulos bajan en un periodo de 6-9 meses y, a veces, ya no son detectables a los 12 meses (Buhles et al, 1974; Weisiger et al, 1975). No obstante, se han descrito casos en los que el título de anticuerpos se mantiene elevado incluso 31 meses después del inicio del tratamiento (Perille y Matus, 1991). Sin embargo, en estos casos los niveles de globulinas suelen normalizarse (Greene y Harvey, 1984). Este hecho permite diferenciar portadores crónicos de perros con la infección superada tras el tratamiento; en los primeros observaremos que persisten otras anomalías como la hiperproteinemia o la trombocitopenia (Buhles et al, 1974).

Recientemente, se han detectado perros tratados en los que, a la persistencia en el título de anticuerpos, se unen alteraciones hematológicas, en concreto trombocitopenias; en este sentido se ha sugerido la posible existencia de resistencias frente a la terapia microbiana empleada (Breitschwerdt et al, 1992).

Como ocurre con otras enfermedades infecciosas, los altos títulos de anticuerpos no confieren inmunidad protectora por lo que una nueva exposición a garrapatas infectadas podrá originar de nuevo un cuadro de ehrlichiosis, aunque suele cursar de un modo menos grave (Amyx et al, 1971; Buhles et al, 1974; Weisiger et al, 1975).

La menor titulación que se valora con esta técnica (1:10) es frecuentemente considerada positiva para *E.canis* (Buhles et al, 1974); sin embargo, en muestras contaminadas por bacterias pueden darse falsos positivos con títulos bajos (a veces pueden ser superiores a 1:80) (Codner y Woody, 1986, referido por Woody y Hoskins, 1991). Por ello, los títulos bajos se deben confirmar con la demostración de una seroconversión en 2 muestras sucesivas. Tanto un título que se ha incrementado en el

tiempo como uno marcadamente positivo se consideran indicativos de infección activa por *E.canis* (Troy y Forrester, 1990).

En principio, un título positivo de inmunofluorescencia indirecta únicamente indica exposición del animal al agente rickettsial; sin embargo un título positivo junto con una historia clínica y signos clínicos o laboratoriales compatibles con la enfermedad, confirmarían un diagnóstico de enfermedad o, al menos, de infección (Greene, 1995).

Debido a la puesta en marcha de diferentes técnicas de cultivo en líneas celulares y a la consiguiente producción masiva de antígeno, se han desarrollado recientemente otras técnicas inmunológicas, como el enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA) y el inmunoblot (Nyindo et al, 1991; Anderson et al, 1992b; Brouqui et al, 1992; Rikihisa et al, 1992; Shankarappa et al, 1992; Cadman et al, 1994). Con las técnicas de inmunoblot podemos detectar una banda polipeptídica de 25-kd en las fases más precoces de la enfermedad (Nyindo et al, 1991). Con el reciente descubrimiento de nuevas especies de *Ehrlichia*, algunos autores apuestan por estas técnicas debido a su validez a la hora de realizar una caracterización más exacta del agente causal (Greene, 1995). Existen otros métodos útiles para la realización de muestreos amplios como la aglutinación en placa de látex; no obstante, los resultados deben confirmarse posteriormente con la inmunofluorescencia indirecta (Ristic y Boothe, 1987).

El PCR también se ha empleado para la detección de *E.canis* tanto en muestras sanguíneas como en diferentes tejidos, si bien no es una técnica de aplicación rutinaria y la sensibilidad es similar o ligeramente inferior a la de otras técnicas de uso habitual como la IFI o el ELISA (Iqbal et al, 1994b; Iqbal y Rikihisa, 1994).

C) DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

La sintomatología clínica de la ehrlichiosis canina es muy variada e inespecífica por lo que puede ser confundida con un gran número de patologías (Woody y Hoskins, 1991). No obstante, fundamentalmente debe diferenciarse del mieloma múltiple, linfoma, leucemia linfocítica crónica y lupus eritematoso sistémico. En un perro con un cuadro crónico de pérdida de peso, esplenomegalia, linfadenopatía generalizada, pancitopenia, plasmocitosis en médula ósea y gammopatía monoclonal, el único modo para diferenciar ehrlichiosis canina de mieloma múltiple es obtener una serología positiva para *E.canis* (Breitschwerdt et al, 1987). Esta también es la única forma de distinguir ehrlichiosis de leucemia linfocítica crónica en un animal con pérdida de peso, linfadenopatía leve, hepatoesplenomegalia, linfocitosis y gammopatía monoclonal.

Por otra parte, la ehrlichiosis puede confundirse con una trombocitopenia inmunomediada, en casos con trombocitopenia y megacariocitosis en la médula ósea (Couto, 1992). Sin embargo, los perros con trombocitopenia inmunomediada suelen padecer cuadros hemorrágicos, mientras que, habitualmente, no presentan fiebre ni síntomas generales (Troy y Forrester, 1990).

Enfermedades como la babesiosis, hepatozoonosis y hemobartonelosis, por la similitud de sus vectores y, a veces, de su sintomatología, también deben ser descartadas (Bool y Suttmöller, 1957; Elias y Homans, 1988). Los casos con sintomatología hemorrágica, linfadenopatía e hiperproteïnemia con hipergammaglobulinemia, en nuestra área geográfica, deben diferenciarse de la leishmaniosis canina (Tesouro et al, 1993).

2.6.7. TRATAMIENTO

TRATAMIENTO ESPECIFICO

A lo largo de la historia y desde la descripción de la ehrlichiosis canina, se han venido empleando en su tratamiento un gran número de fármacos como el tripán azul, acaprina, gonacrina, sales orgánicas de antimonio y de arsénico y solución salina formolada, aunque con todos ellos la respuesta ha sido decepcionante (Ewing, 1969; Ghorbel et al, 1993a).

Los resultados obtenidos con la sulfametacina y la sulfameracina fueron muy variables (Malherbe, 1948), mientras que el uso de sulfonamidas y de penicilina resultó ser inefectivo (Malherbe, 1948; Buckner y Ewing, 1967). Con estos fármacos, puede producirse una inicial mejoría clínica, si bien la respuesta es variable y, generalmente, la infección no desaparece (Breitschwerdt, 1995).

Los antibióticos del grupo de las tetraciclinas se han venido utilizando de un modo rutinario en el tratamiento de la ehrlichiosis canina (Ewing, 1969; Amyx et al, 1971; Buhles et al, 1974; Willder, 1977; Davidson et al, 1978; Van Heerden e Immelman, 1979). Estos fármacos provocan coloración dental en los animales jóvenes, en los que se desaconseja su empleo (Buhles et al, 1974).

La duración del tratamiento parece ser más importante que la dosis o la frecuencia de administración de este grupo de fármacos (Woody y Hoskins, 1991). Sin embargo, algunos autores recomiendan, en fases agudas, dosis menores que en fases crónicas (Van Heerden e Immelman, 1979; Troy y Forrester, 1990).

La utilidad de la tetraciclina o la oxitetraciclina en el tratamiento de este proceso ha sido referida en múltiples ocasiones (Amyx et al, 1971; Buhles et al, 1974; Price et

al, 1987; Adawa et al, 1992). Para la tetraciclina, las dosis recomendadas son de 66 mg/kg/día repartidos en 2 ó 3 tomas por vía oral, durante 14-21 días (Amyx et al, 1971; Price y Dolan, 1980, Greene y Harvey, 1984). Su administración puede prolongarse hasta incluso 8 semanas (Woody y Hoskins, 1991). Estos fármacos deben ser tomados, al menos, 2 ó 3 horas antes o después de la ingestión de alimentos; la quelación de la tetraciclina con ciertos iones, como el calcio, magnesio o hierro, puede disminuir su absorción en el tracto digestivo (Longhofer, 1988).

Algunos protocolos han empleado oxitetraciclina de larga duración por vía intramuscular, si bien debido al dolor causado en el lugar de inyección se recomienda la administración conjunta de piroxicam (Adawa et al, 1992).

En perros infectados experimentalmente, la oxitetraciclina administrada durante 14-18 días, a las dosis comentadas, es capaz de producir la desaparición de *E.canis* cuando el tratamiento se inicia en fase aguda (Buhles et al, 1974; Ghorbel et al, 1993a). Otros autores describen que este fenómeno sólo se produce en, aproximadamente, el 25% de perros tratados (Price y Dolan, 1980).

Aunque la normalización de las alteraciones hematológicas es mucho más lenta que en perros tratados en fase aguda, la oxitetraciclina también se ha mostrado efectiva en el tratamiento de animales con infección crónica (Buhles et al, 1974).

La doxiciclina es una tetraciclina semisintética (en concreto, alfa-6-deoxi-5-oxitetraciclina) liposoluble, que se absorbe en el tracto digestivo más fácilmente que la oxitetraciclina (Shaw y Rubin, 1986). Tras su absorción, el antibiótico se une a proteínas y penetra fácilmente en los tejidos alcanzando, tanto en ellos como en sangre, concentraciones mayores que otras tetraciclinas (Shaw y Rubin, 1986; Van Heerden e Immelman, 1979). Por ello, algunos autores señalan su efectividad en perros que no han respondido a la terapia con tetraciclina (Troy y Forrester, 1990).

Debido a su gran liposolubilidad, su eliminación renal es más lenta que la de la oxitetraciclina; este hecho, unido a su alto grado de absorción en los tejidos, da lugar a que su vida media en suero sea de, aproximadamente, 19.5 horas, en comparación con las 9.5 de la oxitetraciclina (Huber, 1977). Su baja nefrotoxicidad hace que sea recomendable su empleo en perros con insuficiencia renal (Van Heerden e Immelman, 1979). Aquellos individuos que son tratados con doxiciclina presentan una menor incidencia de recaída o reinfección que los tratados con oxitetraciclina (Codner, 1986, referido por Troy y Forrester, 1990).

La doxiciclina se suele emplear a dosis de 5-10 mg/kg cada 12-24 horas, durante 7-10 días, por vía oral (Van Heerden e Immelman, 1979; Van Heerden, 1982; Greene y Harvey, 1984), si bien otros autores recomiendan una mayor duración del tratamiento (Davoust et al, 1991a; Iqbal y Rikihisa, 1994a; Davoust, 1994). Si se presentan vómitos, se puede utilizar la vía endovenosa (Van Heerden e Immelman, 1979).

Recientemente, se han llevado a cabo estudios acerca de la sensibilidad *in vitro* de *E.canis* frente a diferentes antibióticos, resultando ser la doxiciclina el más eficaz de todos (Brouqui y Raoult, 1993). Esta actúa estimulando la fusión entre fagosoma y lisosoma que, en ausencia de tratamiento, es capaz de inhibir *E.canis* (Brouqui y Raoult, 1993). También ejerce una actividad bacteriostática implantándose en los ribosomas de la bacteria e inhibiendo, de ese modo, la síntesis de proteína bacteriana (Brouqui y Raoult, 1993).

La minociclina es otra tetraciclina semisintética y liposoluble, similar a la doxiciclina, que también se ha utilizado en el tratamiento de la ehrlichiosis canina (Troy y Forrester, 1990).

El dipropionato de imidocarb (dipropionato de 3,3'-bis-(2-imidazolin-2-il)-carbanilida) es una diamidina que ha mostrado gran actividad tanto curativa como

profiláctica en babesiosis canina (Euzéby et al, 1980; Kuttler, 1980; Coll et al, 1982). Este fármaco también se ha utilizado con éxito en la terapéutica de la ehrlichiosis (Price y Dolan, 1980; Ogunkoya et al, 1981; Adeyanju y Aliu, 1982). Las dosis empleadas varían de 5 a 7 mg/kg, utilizando la vía intramuscular o subcutánea, en una sola inyección (Ogunkoya et al, 1981; Van Heerden y Van Heerden, 1981; Adeyanju y Aliu, 1982) o en 2 separadas por un intervalo de 15 días (Price y Dolan, 1980). Este último protocolo con 2 dosis se recomienda especialmente en infecciones concurrentes con babesiosis (Price y Dolan, 1980; Pennisi, 1989). Recientemente se ha descrito un nuevo protocolo similar al anterior, pero con una separación entre las 2 inyecciones de 12 semanas (Matthewman et al, 1994b).

Debido al carácter ácido de la solución empleada, pueden aparecer dolor y nódulos, producto de la reacción local, en la zona de inyección (Villemin et al, 1984). Su incidencia no se modifica con la dilución del producto en suero fisiológico o en agua destilada. La frecuencia de presentación y el grado de estas reacciones es independiente de la vía utilizada (intramuscular o subcutánea) (Villemin et al, 1984).

El imidocarb a dosis terapéuticas provoca, a veces, efectos secundarios transitorios y dependientes de la dosis; aproximadamente a los 10-20 minutos de su administración, puede aparecer un cuadro de sialorrea, secreción oculonasal de tipo seroso, diarrea, disnea, taquicardia y temblores (Adams et al, 1980; Price y Dolan, 1980; Woody y Hoskins, 1991). Estos signos pueden ser el resultado de un efecto anticolinesterasa provocado por el fármaco (Ogunkoya et al, 1981; Adeyanju y Aliu, 1982). Por ello, este cuadro puede ser controlado con la administración de sulfato de atropina a dosis de 0.05 mg/kg (Price y Dolan, 1980).

Su mecanismo de acción no es bien conocido en el tratamiento de la ehrlichiosis canina; en el caso de la babesiosis, las diamidinas, en general, actúan combinándose con los ácidos nucleicos y produciendo la desnaturalización de la doble hélice de estos

microorganismos (Newton, 1967).

Los resultados obtenidos *in vivo* con este tratamiento son variables ya que, mientras algunos autores constatan su efecto terapéutico (Ogunkoya et al, 1981) e incluso lo consideran más eficaz que la tetraciclina (Price y Dolan, 1980), otros han obtenido respuestas decepcionantes (Van Heerden y Van Heerden, 1981). También se ha recomendado su empleo en perros en fase crónica resistente a otros tratamientos (Price y Dolan, 1980; Longhofer, 1988). En contraste, estudios realizados *in vitro* muestran que *E.canis* es resistente al dipropionato de imidocarb (Brouqui y Raoult, 1993).

El amicarbalide (3,3'-diamidinocarbanilida diisetonato) es un derivado de las diamidinas empleado en babesiosis. También se ha utilizado en la ehrlichiosis a dosis de 5-6 mg/kg, por vía intramuscular, con 2 únicas inyecciones separadas entre sí por un periodo de 15 días, si bien los estudios realizados al respecto son escasos (Troy y Forrester, 1990).

A pesar de que en diferentes trabajos, tanto *in vitro* como *in vivo*, el cloranfenicol no se ha mostrado útil en el tratamiento de la ehrlichiosis (Buckner y Ewing, 1967; Brouqui y Raoult, 1993), se ha utilizado fundamentalmente en cachorros menores de 5 meses, en los que se pretende evitar la coloración dental que se produciría al emplear tetraciclinas a esta edad (Troy y Forrester, 1990; Woody y Hoskins, 1991); también puede administrarse a hembras gestantes o lactantes (Woody y Hoskins, 1991). Los protocolos utilizados varían desde los 15 a los 50 mg/kg cada 8 horas durante 14 días, generalmente por vía oral, aunque también pueden emplearse las vías intravenosa y subcutánea (Troy y Forrester, 1990; Woody y Hoskins, 1991).

Según otros autores, el cloranfenicol podría ser más efectivo que las tetraciclinas en la eliminación de la infección, por lo que debería emplearse en casos resistentes a

las tetraciclinas (Troy y Forrester, 1990). Sin embargo, debido a su toxicidad sobre la médula ósea, no es un fármaco de primera elección en perros anémicos y/o trombocitopénicos (Troy y Forrester, 1990).

Las quinolononas, y más concretamente la enrofloxacin y la ciprofloxacina, a dosis terapéuticas pueden presentar una actividad antirickettsial (Troy y Forrester, 1990; Brouqui y Raoult, 1992; Couto, 1994), si bien son necesarias nuevas investigaciones al respecto, ya que algunos autores consideran que su eficacia en este proceso no es muy elevada (Greene, 1995).

Por último, señalar que también se ha recomendado el empleo de la vincristina a dosis de 0.01 mg/kg cada 7 días, vía intravenosa (Hibler et al, 1986).

TRATAMIENTO DE APOYO

Junto a la terapia específica, en ocasiones es necesaria la instauración de un tratamiento de apoyo, fundamentalmente en perros con infección crónica (Hibler et al, 1986). En casos con lesión renal o hepática secundaria a la ehrlichiosis, este tratamiento de apoyo, en ocasiones, debe perpetuarse de por vida (Woody y Hoskins, 1991).

El empleo de glucocorticoides a dosis inmunosupresoras (prednisolona o dexametasona) durante 2-7 días puede ser una medida a adoptar en casos con marcada trombocitopenia, en los que la vida del perro esté comprometida (Walker et al, 1970, Hibler et al, 1986). Esta medida podría justificarse por la naturaleza inmunomediada de la trombocitopenia y de la alteración en la funcionalidad plaquetaria (Hibler et al, 1986; Troy y Forrester, 1990).

Debido a la dificultad con la que, a veces, nos encontramos para diferenciar la ehrlichiosis de la trombocitopenia inmunomediada, en ocasiones, es necesario instaurar

inicialmente un tratamiento combinado de glucocorticoides y tetraciclinas, a la espera de los resultados serológicos (Troy y Forrester, 1990). Sin embargo, en líneas generales, los glucocorticoides no deben emplearse a dosis elevadas o durante largos periodos de tiempo, ya que su efecto inmunosupresor puede interferir en la eliminación del microorganismo (Greene y Harvey, 1984; Woody y Hoskins, 1991).

A veces pueden aparecer infecciones secundarias resistentes a las tetraciclinas, en cuyo caso debe instaurarse una terapia antibiótica combinada. Para la elección de este tratamiento debe tenerse en cuenta, por un lado, la compatibilidad entre ambos antibióticos y, por otro, la sensibilidad del agente causal de la infección secundaria (Woody y Hoskins, 1991).

En animales deshidratados, deberá procederse a la instauración de una correcta fluidoterapia (Greene y Harvey, 1984; Woody y Hoskins, 1991). En perros con anemia grave o que han presentado hemorragias que comprometan su vida, se recomienda la realización de tantas transfusiones como sean necesarias, hasta que la médula ósea comience a responder (Pyle, 1980; Greene y Harvey, 1984; Woody y Hoskins, 1991). Para ello puede utilizarse sangre completa o plasma rico en plaquetas. A veces, para controlar epistaxis severas se recomienda el empleo de adrenalina intranasal (Greene y Harvey, 1984).

La estimulación de la médula ósea con esteroides andrógenos puede ser útil en animales con pancitopenia y con hipoplasia o aplasia medular. Para ello se ha utilizado oximetolona por vía oral a dosis de 1 mg/kg cada 8 horas, o bien, decanoato de nandrolona por vía intramuscular a dosis de 1-1.5 mg/kg en inyecciones semanales (Greene y Harvey, 1984; Woody y Hoskins, 1991).

En esta terapia de apoyo, también algunos autores han empleado levamisol debido a sus propiedades inmunoestimulantes (Van Heerden, 1982).

2.6.8. EVOLUCION POST-TRATAMIENTO Y PRONOSTICO

Aunque normalmente la evolución de los casos de ehrlichiosis canina, tras la instauración de un tratamiento específico, suele ser favorable, cuando existe aplasia medular y pancitopenia los enfermos suelen responder más lentamente; estas alteraciones pueden ser irreversibles, perpetuándose el riesgo de presentación de hemorragias graves o la aparición de septicemias secundarias a neutropenias (Buhles et al, 1974; Greene y Harvey, 1984).

Habitualmente en perros con infección aguda o crónica leve, con sintomatología inespecífica y recuentos leucocitarios normales, la respuesta al tratamiento suele ser evidente en 24-48 horas (Troy y Forrester, 1990). En el resto de las formas crónicas, pueden pasar hasta 6 semanas antes de que aparezca una evidente respuesta favorable al tratamiento (Woody y Hoskins, 1991). Esta respuesta también puede verse comprometida en casos con insuficiencia renal o hepática (Woody y Hoskins, 1991).

En la mayoría de los casos, la mejoría clínica suele preceder a la normalización de los valores hematológicos (Troy y Forrester, 1990). A pesar de que los perros con celularidad medular normal suelen responder en 2-4 días al tratamiento, el estado de la médula ósea no es un parámetro totalmente fiable para predecir el tiempo que tardarán en desaparecer las alteraciones hematológicas en un perro con ehrlichiosis (Woody y Hoskins, 1991). No obstante, en perros con hipoplasia medular este periodo de tiempo suele ser de varios meses (Hibler et al, 1986).

2.6.9. PROFILAXIS

La profilaxis de la ehrlichiosis canina debe estar basada en el control de garrapatas, tanto en el animal como en el medio (Keefe et al, 1982; Garris, 1991).

Debido a su gran especificidad de hospedador, *R.sanguineus* se ha adaptado perfectamente al medio que rodea al perro, por lo que es frecuente encontrarla en perreras y en los lugares en los que duerme durante todo el año (Greene et al, 1985; Lewis et al, 1977). Las garrapatas son capaces de ascender por las paredes y pueden introducirse en pequeñas grietas; por ello un buen método de control en estas zonas puede ser, simplemente, intentar tapar todas las grietas aunque estén a una altura considerable (Garris, 1991). La inspección frecuente de los perros para la detección de garrapatas también es una sencilla técnica que puede reducir la presencia de futuras infestaciones (Cupp, 1991; Garris, 1991).

Por otro lado, el control de garrapatas en el perro puede llevarse a cabo mediante métodos de lucha biológica, hormonal y, fundamentalmente, química utilizando collares impregnados con insecticidas, o bien con soluciones externas, tanto en forma de baños como de pulverización (Cupp, 1991).

En el control de *R.sanguineus*, se requiere un tratamiento inmediato de los animales infestados que debe unirse al empleo de un insecticida residual que actúe frente a las larvas que eclosionarán de los huevos (Cupp, 1991).

Aunque están apareciendo resistencias a algunos productos (Luguru et al, 1984), existe un gran número de sustancias útiles para el tratamiento de las infestaciones por garrapatas (Garris, 1991). Entre ellos, para el perro destacan, bajo diferentes formas comerciales, los derivados organofosforados, piretroides (cipermetrin y deltametrin) y algunos carbamatos como carbaril y propoxur (Cupp, 1991; Rodríguez, 1993; Estrada, 1994). El empleo de ivermectina ha mostrado una gran efectividad en las infestaciones por ectoparásitos, si bien la respuesta frente a algunas especies de ixódidos es irregular (Cupp, 1991).

La introducción de nuevos perros en colectividades caninas debe realizarse con

un periodo de aislamiento previo. Los animales con títulos positivos a la técnica de inmunofluorescencia indirecta deben tratarse, no introduciendo estos perros en el grupo hasta que los resultados se hagan negativos (Pyle, 1980). En este sentido, una pauta idónea para un buen programa de control sería la realización de análisis serológicos periódicos cada 6-9 meses (Woody y Hoskins, 1991).

En relación con los perros donantes, éstos deben ser seronegativos en dos muestras separadas por 1 mes entre sí. La analítica se repetirá anualmente (Woody y Hoskins, 1991).

En aquellos casos en los que sea difícil la erradicación de las garrapatas y/o no sea económicamente posible realizar el control serológico de todos los animales de un colectivo, éstos pueden someterse a tratamientos específicos preventivos de larga duración, de modo que las garrapatas completarían un ciclo de su desarrollo sin poder ejercer su capacidad infectante (Gilbert et al, 1992). Para ello se han empleado, en los periodos de mayor densidad de garrapatas, tetraciclina (3-15 mg/kg) o doxiciclina (1-3 mg/kg) cada 24 horas por vía oral, o bien oxitetraciclina a una dosis total de 200 mg por vía intramuscular cada 3-4 días (Amyx et al, 1971; Davidson et al, 1978; Breitschwerdt, 1995).

Como consecuencia del movimiento de la población canina y de la existencia de perros portadores asintomáticos, siempre se corre el riesgo de que aparezcan nuevos focos enzoóticos en zonas no afectadas previamente (Magnarelli et al, 1990).

Hasta el momento no existe ninguna vacuna frente a la ehrlichiosis canina (Breitschwerdt, 1995), aunque recientemente se han fabricado dos frente a otra especie del género *Ehrlichia*, en concreto *E. risticii* (Palmer, 1989); también se ha puesto a punto otra vacuna frente a una especie muy relacionada con dicho género, *C. ruminantium*, empleando microorganismos inactivados (Martinez et al, 1994). Sin

embargo, los intentos realizados empleando *E.canis* inactivados no han tenido ningún valor profiláctico en la prevención de ehrlichiosis canina (Ristic et al, 1991).

2.7. EHRLICHIOSIS EN ESPAÑA

Aunque la existencia de ehrlichiosis canina en España se conoce desde hace años, la primera descripción bibliográfica data de 1988 en Cataluña (Font et al, 1988); en concreto se trataba de 10 casos clínicos en forma aguda. Desde entonces únicamente existen referencias de su existencia en Levante (Rodríguez, 1990), en la zona central (Anda et al, 1990) y en Galicia (López, 1994).

Se ha descrito concurrencia de ehrlichiosis con otros procesos como leishmaniosis (Tesouro et al, 1993), hepatozoonosis (Cairó et al, 1994), filariosis (Rodríguez, 1990) y babesiosis canina (Tesouro et al, 1993; López, 1994; Núñez-Torrón, 1996).

R.sanguineus, vector de la ehrlichiosis canina, presenta una amplia distribución en la mayoría de las provincias españolas, incluidas las de la zona centro de España (Cordero del Campillo, 1980; Herrero et al, 1992). En concreto, en un reciente estudio epizootiológico en perros abandonados en la provincia de Madrid, la única especie de garrapata identificada fue *R.sanguineus*, siendo su prevalencia del 61.5% (Olmeda et al, 1993).

Otra especie de *Ehrlichia* que ha sido identificada en nuestro país es *E.phagocytophila*, concretamente en vacas en el País Vasco (Juste et al, 1989).

En cuanto a la ehrlichiosis humana, son pocos los estudios realizados al respecto en España. El primero de ellos se llevó a cabo con muestras de pacientes con fiebre

botonosa mediterránea, analizando 41 pares de sueros con la técnica de inmunofluorescencia indirecta frente a *E.canis*. Un paciente mostró una seroconversión con elevación de cuatro veces en el título de anticuerpos y, otro, presentó un título bajo estacionario. Los autores plantean que este hallazgo podría ser debido a una infección por *E.canis* o por otro microorganismo relacionado con ella, como *E.chaffeensis*, o simplemente podría estar justificado por la existencia de una infección mixta o una reacción cruzada (Guerrero et al, 1991; Guerrero, 1993).

Tras el aislamiento de *E.chaffeensis* se llevó a cabo un estudio de anticuerpos frente a esta especie en 100 sueros en la provincia de Soria encontrando, entre ellos, uno positivo y otro dudoso (Saz et al, 1994). Las manifestaciones clínicas observadas por los autores recordaban más a la infección por *E.sennetsu*, si bien la sintomatología de la ehrlichiosis humana puede presentar una gran variabilidad clínica.

Recientemente, tras la descripción de casos de ehrlichiosis granulocítica en Estados Unidos (Chen et al, 1994), se ha sugerido la posible implicación de *E.phagocytophila* en la etiología de la ehrlichiosis humana en España (Oteo et al, 1995).

Ante esta situación, la realización de nuevos estudios epidemiológicos nos ayudará a conocer la existencia de infección por diferentes especies de *Ehrlichia* en España (Segura, 1994).

3. Materiales y métodos

3.1. PLAN DE TRABAJO

Ante la situación planteada en la introducción de este estudio, nos propusimos el siguiente plan de trabajo, para alcanzar los objetivos propuestos:

- En primer lugar nos encontramos con la necesidad de realizar la adaptación de técnicas que facilitaran el diagnóstico de la ehrlichiosis. Por ello, el procedimiento inicial fue la puesta a punto de la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos frente a *E.canis*. Este estudio fue llevado a cabo en nuestro Departamento, contrastando los resultados con otro Laboratorio de Referencia, concretamente con el Centro de Estudios de Vectores de Aguas de Moura (Portugal).

- Además, decidimos realizar un estudio clínico y biopatológico de un número elevado de perros diagnosticados de ehrlichiosis canina, para facilitar el diagnóstico de presunción basado en el cuadro sintomático.

- Debido a la gran variabilidad en la respuesta a los diferentes tratamientos, encontrada al consultar la bibliografía al respecto, nos propusimos valorar la eficacia terapéutica de distintos protocolos en perros con ehrlichiosis canina. Concretamente planeamos el estudio de tres tratamientos: doxiciclina, dipropionato de imidocarb y un protocolo mixto (doxiciclina y dipropionato de imidocarb).

- Por último, con el fin de conocer la situación real de la ehrlichiosis canina en la Comunidad Autónoma de Madrid, diseñamos un estudio epizootológico en esta zona que incluyera dos aspectos:

- a) un estudio descriptivo sobre diferentes aspectos epizootiológicos de este proceso.
- b) un estudio analítico para estimar la seroprevalencia frente a *E.canis* y la implicación de diferentes factores de riesgo como la raza, edad, sexo, presencia de garrapatas, aptitud, hábitat y convivencia con otros perros.

3.2. DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO: INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

El fundamento de esta técnica está basado en el empleo de sustancias fluorescentes (como la fluoresceína o la rodamina) las cuales se pueden unir a anticuerpos sin variar su especificidad. En el desarrollo de dicha técnica, inicialmente, enfrentamos el suero problema con el antígeno. En el caso de que en el suero problema se encuentren anticuerpos específicos, éstos se visualizarán tras añadir un suero antiinmunoglobulina específica conjugado con un fluorocromo (Coligan et al, 1992).

Antígeno utilizado

El antígeno empleado fue cedido por Laboratorios Rhône Mérieux S.A. y consistía en células de la línea DH-82 infectada por *E.canis* (Dawson et al, 1991). El porcentaje de células infectadas en el cultivo era de, aproximadamente, el 60% del total.

Una vez recibido el antígeno, se procedía a su purificación para evitar reacciones con antígenos solubles, mediante centrifugación (a 500 g durante 5 minutos) y lavados sucesivos en PBS hasta la obtención de un sobrenadante limpio.

La concentración celular final era de 32.10^6 células/ml en buffer-fosfato (PBS) más 0.5% de seroalbúmina bovina (BSA) a un pH de 7.2. Esta concentración permite la observación de aproximadamente 10 células por campo.

La suspensión celular era colocada en portas especiales esmerilados de inmunofluorescencia de 18 pocillos de 4mm (Cultek); en cada pocillo se depositaban 5 microlitros y se dejaban secar al aire. Las preparaciones, una vez secadas, eran almacenadas congeladas a -20°C .

En el momento de su uso, los portas se descongelaban y se dejaban secar en estufa a 37°C durante 15 minutos; a continuación, se fijaban con acetona.

Técnica de inmunofluorescencia indirecta

La técnica comprende los dos clásicos tiempos de reacción: un primer tiempo en el que se ponen en contacto el antígeno con los sueros problema y un segundo tiempo en el cual se añade la anti-inmunoglobulina canina conjugada con el marcador fluorescente (Coligan et al, 1992).

- Primer tiempo de reacción:

En las microplacas los sueros problema se diluyen en tampón fosfato (PBS) a pH de 7.2. Las diluciones empleadas son de 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320. En aquellos casos que resultan positivos con un título superior a 1:320 se continúa realizando diluciones hasta alcanzar el título final.

En cada pocillo de los portas depositamos una gota de 25 microlitros de las siguientes diluciones: 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320 de cada suero; dado que tienen 18 pocillos se analizan, por tanto, 4 muestras diferentes en cada porta. Los 2 círculos

MATERIALES Y METODOS

restantes son rellenados por dos sueros controles, uno positivo y otro negativo. Tanto los sueros problemas como los controles se mantienen en congelación a -20°C hasta el momento de su análisis.

El control positivo pertenece a un perro con un cuadro clínico compatible con ehrlichiosis y con presencia de cuerpos de inclusión de *E.canis* en el interior de linfocitos y de monocitos. El control negativo procede de un perro clínicamente sano. Ambos sueros fueron testados, en repetidas ocasiones, en el Centro de Estudios de Vectores de Aguas de Moura (Portugal) por la técnica de inmunofluorescencia indirecta frente a *E.canis*, con antígeno obtenido a partir de la línea celular DH82 infectada. Este antígeno fue cedido al Centro portugués por la Dra.J.E.Dawson y procedía del Centers for Diseases Control and Prevention de Atlanta. El título obtenido para el control positivo fue de 1:10240, siendo precisamente ésta la dilución de trabajo.

A continuación, los portaobjetos se introducen en cámara húmeda en estufa a 37°C durante 30 minutos. Tras esta fase de incubación, los portas son sometidos a tres lavados de 5 minutos en PBS en agitación, cambiando la solución de PBS entre cada lavado. Posteriormente, los portas son secados con aire frío.

- Segundo tiempo de reacción:

Tras su secado, se añade a cada pocillo 25 microlitros de conjugado; este conjugado está constituido por una anti-IgG de perro obtenida en conejo y marcada con isotiocianato de fluoresceína (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.) a una dilución de 1:100 en PBS a $\text{pH}=7,2$. A continuación y al igual que en el primer tiempo de reacción, se introducen los portas en cámara húmeda en estufa a 37°C durante 30 minutos.

Tras tres lavados en PBS y su correspondiente secado, las preparaciones son

montadas para su lectura, colocando 3 gotas de glicerina tamponada especial para inmunofluorescencia (Fluoprep[®], Biomérieux) y, sobre ellas, un cubreobjetos.

- Lectura:

La lectura se realiza con un microscopio de epifluorescencia (Olympus BH-2[®]), con filtro azul, empleando el objetivo de x40 aumentos.

Se comienza observando los pocillos controles para comprobar su positividad o negatividad; a continuación se leen los sueros problemas. El título de anticuerpos es la máxima dilución del suero a la cual se detecta una evidente fluorescencia.

3.3. ESTUDIO CLINICO DE LA EHRLICHIOSIS CANINA

En este apartado tratamos de realizar un estudio completo acerca del cuadro clínico con el que se presenta la ehrlichiosis canina en nuestra área de influencia.

Los perros incluidos en este estudio debían cumplir alguno de estos requisitos:

- presentar, en la técnica de inmunofluorescencia indirecta frente a *E. canis*, un título de anticuerpos mayor de 1:20. Este título debía estar acompañado de un cuadro clínico o bien de alteraciones biopatológicas compatibles con la enfermedad.

- tener, inicialmente, un título menor o igual a 1:20 con un aumento de, al menos, 2 títulos en una segunda muestra tomada 15-21 días después de la primera. Estos casos se correspondían con perros en fase aguda de la enfermedad por lo que en todos los casos se intentó confirmar el diagnóstico con la observación microscópica de cuerpos intracitoplasmáticos de *E. canis* en frotis de sangre de dos tipos de muestras diferentes:

- * muestras de sangre capilar obtenida tras la realización de una pequeña incisión, con una hoja de bisturí, en la cara interna del pabellón auricular.

- * sangre obtenida de la vena cefálica y sometida a una técnica de leucoconcentración de la forma que a continuación se detalla: la sangre es introducida en capilares de microhematocrito, los cuales son centrifugados a 10000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga de microhematocrito (Centrífugas Orto). A continuación, se corta el capilar por la zona de la capa de glóbulos blancos, realizándose en porta una extensión de dicha capa.

El número total de animales incluidos en este estudio es de 171, los cuales procedían de las consultas del Departamento de Patología Animal I y II de la Facultad de Veterinaria de Madrid o de clínicas veterinarias privadas enmarcadas en esta Comunidad Autónoma. Estos animales acudieron a estas consultas entre noviembre de 1992 y junio de 1995. De ellos 115 eran machos y 56 hembras.

Estos perros fueron sometidos a una anamnesis detallada y a un examen clínico. En todos los casos se intentaba realizar un diagnóstico diferencial del modo más completo posible. Como hemos comentado en la revisión bibliográfica, este proceso puede presentarse con cierta frecuencia asociado a otras enfermedades cuyos síntomas aparecen de un modo concurrente, dificultando el diagnóstico desde un punto de vista clínico. Para evitar esto, todos los casos incluidos en este estudio eran considerados negativos, por IFI, a leishmaniosis (Tesouro, 1984). Además, eran descartados aquellos perros en cuyas extensiones sanguíneas se observaban *Babesia spp*, *Hepatozoon canis* o *Haemobartonella canis*.

Con el fin de que los datos recogidos en la anamnesis y en la exploración fueran homogéneos, se confeccionó una ficha que fue rellenada por el clínico que hacía el

seguimiento del caso. Los síntomas fueron agrupados de acuerdo con la clasificación realizada por Woody y Hoskins en relación con el cuadro clínico de esta enfermedad (Woody y Hoskins, 1991). Esta ficha aparece detallada a continuación:

Nº Registro	Fecha	
Procedencia		
-----		SINTOMAS GENERALES
Propietario		Fiebre SI NO
Domicilio		Adelgazamiento SI NO
Teléfono		Adinamia SI NO
-----		Anorexia SI NO
Raza	Edad	Apatía SI NO
Sexo		Hemorragias SI NO
Tipo de pelo	Color	Hepatomegalia SI NO
NOMBRE		Esplenomegalia SI NO
-----		Mucosas:
DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD		Ganglios:
-----		APARATO LOCOMOTOR
-----		Cojeras SI NO
-----		Hemartrosis SI NO
Primeros Síntomas:		Artritis SI NO
		Reducción masa muscular SI NO
¿Desde cuándo?:		Otros:

OFTALMOLOGIA

Descarga ocular purulenta	SI NO
Hemorragia conjuntival	SI NO
Uveitis anterior	SI NO
Hipema	SI NO
Otros:	

NEUROLOGIA

Convulsiones	SI NO
Ataxia	SI NO
Otros:	

APARATO CARDIOVASCULAR

*Frecuencia:

*Auscultacion:

*ECG:

APARATO RESPIRATORIO

*Frecuencia:	
Descarga nasal	SI NO
Fatiga	SI NO
Tos	SI NO
Otros:	

APARATO DIGESTIVO

Vómitos	SI NO
Diarrea	SI NO
Melena	SI NO
Otros:	

APARATO URINARIO

Hematuria macroscópica	SI NO
Polidipsia	SI NO
Poliuria	SI NO
Otros:	

PIEL

Dermatitis	SI NO
Ulceras	SI NO
Petequias	SI NO
Alopecias	SI NO
Otros:	

APARATO REPRODUCTOR

* MACHOS:

Edema de escroto	SI NO
------------------	-------

* HEMBRAS:

Hemorragia post-parto	SI NO
Aborto	SI NO
Infertilidad	SI NO
Otros:	

Análisis de los datos

Una vez rellenas todas las fichas de los perros incluidos en el estudio clínico, los datos recogidos fueron analizados y procesados mediante el programa informático SIGMA (Horus Hardware, 1987).

3.4. ENSAYO TERAPEUTICO DE LA EHRLICHIOSIS CANINA. ESTUDIO BIOPATOLOGICO

En este apartado nos propusimos estudiar comparativamente la eficacia terapéutica, en el curso de la ehrlichiosis canina, de tres protocolos de tratamiento diferentes: doxiciclina, dipropionato de imidocarb y un tercer tratamiento mixto empleando ambos fármacos al mismo tiempo.

Los criterios de inclusión de los animales en este estudio eran idénticos a los seguidos en el estudio clínico, valorando perros tanto de nuestras consultas como de clínicas privadas.

Con los perros con ehrlichiosis procedentes de las consultas de la Facultad de Veterinaria de Madrid se establecieron 3 grupos de cohortes de forma alternativa, es decir, los sujetos de cada grupo se iban incluyendo secuencialmente en dichos grupos a medida que eran seleccionados. En relación con los casos aportados por veterinarios privados, se respetaba, de entre las 3 pautas empleadas, aquella que era preferida por el clínico, empleando la misma en todos sus casos. En total se han incluido en el estudio 93 perros.

Los 3 grupos de cohortes establecidos fueron:

GRUPO 1-P: perros tratados con doxiciclina, por vía oral, a dosis de 10 mg/kg cada 24 horas durante 28 días. En total este grupo estaba formado por 32 casos.

GRUPO 2-P: perros tratados con dipropionato de imidocarb, por vía subcutánea, a dosis de 5 mg/kg con un protocolo de 2 inyecciones con una separación en el tiempo de 14 días. En dicho grupo se incluyeron 31 casos.

GRUPO 3-P: perros tratados con un protocolo mixto a base de doxiciclina y dipropionato de imidocarb, a las dosis referidas, comenzando el mismo día con los dos fármacos. Este grupo estaba constituido por 30 casos.

Junto a estos grupos de cohortes se incluyeron tres grupos control, formados por perros sanos no infectados. Estos animales presentaron al menos 2 títulos seriados negativos frente a *E.canis* por la técnica de IFI descrita anteriormente. En este sentido, los grupos formados fueron:

GRUPO 1-C: perros no infectados que convivían con algún perro perteneciente al grupo 1-P (n=3).

GRUPO 2-C: perros no infectados que convivían con algún perro englobado en el grupo 2-P (n=3).

GRUPO 3-C: perros no infectados que convivían con algún perro del grupo 3-P (n=2).

El hecho de que estos perros residieran con algún animal de los grupos problemas implica que ambos estaban sometidos a las mismas condiciones de manejo y alimentación fundamentalmente.

Para evitar en lo posible las reinfecciones, los animales eran integrados en un programa profiláctico, en el momento del diagnóstico, con el fin de dificultar nuevas infestaciones por garrapatas. Dicho programa se basaba en el empleo de collares de

amitraz y de baños de cipermetrina, fundamentalmente, durante las épocas de máxima actividad de los ixódidos.

Con el fin de evaluar la eficacia de los 3 protocolos estudiados, los animales eran controlados periódicamente. En todos los casos, estos perros fueron sometidos a estudio el día del inicio del tratamiento (día 0) y tras su finalización.

Además, realizamos una serie de controles programados, cuyo número y periodicidad estuvieron sujetos a pequeñas variaciones en función de la disponibilidad de los propietarios. Dichos controles han sido clasificados para su análisis en los siguientes grupos:

- día 0.
- final de tratamiento.
- 2º trimestre (3-6 meses).
- 4º trimestre (9-12 meses).
- 8º trimestre (21-24 meses).

En cada uno de los días indicados e independientemente del grupo en el que estuviera englobado el perro, se recogían muestras de sangre (en EDTA, en heparina y sin anticoagulante) y de orina con el fin de realizar un control biopatológico e inmunológico que incluía los parámetros que a continuación se detallan.

*** Hematología:**

- recuento de hematíes
- hematocrito
- hemoglobina
- volumen corpuscular medio (VCM)
- hemoglobina corpuscular media (HCM)
- concentración media de hemoglobina corpuscular (CMHC)

MATERIALES Y METODOS

- recuento de leucocitos
- fórmula leucocitaria diferencial, tras tinción con May Grunwald-Giemsa
- recuento plaquetario

Todos estos parámetros, excepto la fórmula leucocitaria, fueron analizados empleando el contador hematológico Microcell counter F-800[®] (Sysmex). En aquellos casos en los que el recuento plaquetario no era fiable, se procedió al recuento manual, empleando el sistema Unopette[®] para determinación de plaquetas (Becton-Dickinson).

* Bioquímica sanguínea:

- proteínas totales: para ello se utilizó un refractómetro (Atago Co., Ltd).
- globulinas, globulinas totales y cociente albumina/globulina. La técnica empleada fue la separación electroforética de las proteínas utilizando la metodología y los materiales recomendados por Atom[®] (concretamente, Atom 502).
- ALT (GPT)
- bilirrubina total
- urea
- creatinina
- glucosa

Estos 5 últimos valores fueron hallados con el analizador de química seca Reflotrón[®] (Boehringer Mannheim), trabajando a 25°C.

* Presencia de cuerpos iniciales o de mórulas de *E.canis* en sangre en EDTA sometida al procedimiento de leucoconcentración ya reseñado anteriormente.

* Urianálisis. Se realizó la determinación en orina de sangre, nitritos, urobilinógeno, bilirrubina, cuerpos cetónicos, glucosa, proteínas y pH, empleando las

tiras reactivas Combur-Test 8® (Boehringer Mannheim). La densidad fue calculada mediante refractometría. En cada caso, se procedió a estudiar el sedimento urinario, para lo cual se utilizó la tinción de Kova (Hycor Biomedical Inc).

* Título de anticuerpos anti-*E.canis* valorado por la técnica de IFI ya descrita.

Junto a esto y con el fin de conocer la respuesta clínica a cada uno de los protocolos de tratamiento estudiados, se determinó, en cada caso, el periodo de tiempo transcurrido hasta la observación de una evidente mejoría clínica. Además, los perros con respuesta desfavorable al tratamiento fueron cambiados de protocolo del siguiente modo:

- los perros del protocolo 1-P (doxiciclina) fueron cambiados al 2-P (imidocarb)
- los perros del protocolo 2-P (imidocarb) fueron cambiados al 1-P (doxiciclina)
- los perros del protocolo 3-P (mixto) fueron sometidos a un nuevo protocolo de tratamiento 3-P.

Por otro lado, aprovechando las analíticas para el control terapéutico, hemos realizado un estudio biopatológico de la ehrlichiosis canina, recogiendo todos los datos biopatológicos e inmunológicos de los 93 perros incluidos en los grupos problema, antes de la instauración de tratamiento alguno.

Análisis de los datos

Los resultados obtenidos fueron analizados y sometidos a estudio estadístico mediante análisis de varianza empleando el programa SIGMA (Horus Hardware, 1987).

3.5. ESTUDIO EPIZOOTIOLOGICO DE LA EHRLICHIOSIS CANINA

El estudio epizootiológico ha comprendido 2 aspectos diferentes:

a) en primer lugar hemos realizado un estudio descriptivo con 2 poblaciones diferentes:

a.1) estudio descriptivo a partir de todos los sueros recibidos en el Servicio de Diagnóstico de ehrlichiosis de nuestro Departamento desde enero de 1993 hasta diciembre de 1995. El número total de sueros recibidos fue de 2523. Con esta población hemos estudiado la seroprevalencia encontrada a lo largo de estos 3 años, incluyendo la distribución trimestral de la misma, considerando como umbral de positividad el título de 1/40 por I.F.I.

a.2) análisis de diferentes características implicadas en la epizootiología de la ehrlichiosis en perros diagnosticados de este proceso empleando la misma población que se ha utilizado para el estudio clínico (171 casos). Para ello se confeccionó una ficha, a rellenar en todos estos casos, en la que se incluía la siguiente información:

EPIZOOTIOLOGIA					
Nombre:	Raza:				
Edad:	Sexo:				
Presencia de garrapatas:	Convive con otros perros:				
Convive con perros con síntomas parecidos:					
Convive con perros con ehrlichiosis:					
Tipo de vivienda:	piso	chalet	finca	criadero	jauría
Zona habitual de residencia:					
Ambiente:	urbano	rural	periurbano		
Cambios de residencia:	no	ocasionales	periódicos		
Aptitud del animal:	compañía	guarda	caza	pastor	

b) Estudio analítico para conocer la tasa de seroprevalencia de ehrlichiosis canina, en 1994, en la Comunidad Autónoma de Madrid y evaluar la existencia de factores de riesgo. La muestra fue calculada mediante el programa Epi-info versión 6 (C.D.C. y W.H.O., 1994), basándonos en el censo oficial canino de la Comunidad Autónoma de Madrid para 1993 (192.562 perros). Con unos datos de frecuencia esperada calculada en torno al 8%, con un error del 3% y para un intervalo de confianza del 99%, el tamaño de la muestra debía ser superior a 195; concretamente, nuestra población fue de 200 sueros o plasmas de perros con domicilio habitual en dicha Comunidad que acudían a las consultas de la Facultad de Veterinaria, tanto por presentar alguna patología médica o quirúrgica como para controles o intervenciones rutinarias. Estos sueros y plasmas se recogieron al azar entre todos los remitidos al Laboratorio de Análisis Clínicos a lo largo de todo el año 1994 (aproximadamente se recogía un suero por cada día lectivo). Con el fin de conocer la posible existencia de factores de riesgo, en todos estos casos se rellenó la misma ficha que aparece reflejada en el epígrafe a.2. de este mismo apartado.

El estudio de los factores de riesgo se realizó empleando el test de la χ^2 mediante el programa informático SIGMA (Horus Hardware, 1987).

Con el fin de completar los datos obtenidos con este muestreo, también contamos con 2 colecciones de sueros, cedidos por el Laboratorio Regional Agrario de la Comunidad Autónoma de Madrid, procedentes de la campaña de vacunación de 1993, de 2 áreas concretas de dicha Comunidad: Aranjuez (93 muestras) y Navalcarnero (76 muestras).

El umbral de positividad considerado fue un título de anticuerpos igual o superior a 1/40 utilizando la técnica de I.F.I.

4. Resultados

4.1. DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO

La puesta a punto de la técnica de inmunofluorescencia indirecta ha supuesto, únicamente, un paso previo para el desarrollo del resto de las fases del trabajo. Se trata de un método inmunológico ampliamente difundido y, en concreto, la línea celular empleada por nosotros es utilizada de una forma rutinaria en diferentes centros de investigación de ehrlichiosis canina.

Con el objeto de contrastar la adaptación de la I.F.I., comparamos los primeros resultados obtenidos por nosotros con los del Centro de Estudios de Vectores de Aguas de Moura (Portugal), fijando el umbral de positividad en un título de 1:40.

Además, comprobamos que nuestra técnica, bajo idénticas condiciones de metodología, presentaba unas excelentes características de repetibilidad y de reproductibilidad de sus resultados.

4.2. ESTUDIO CLINICO

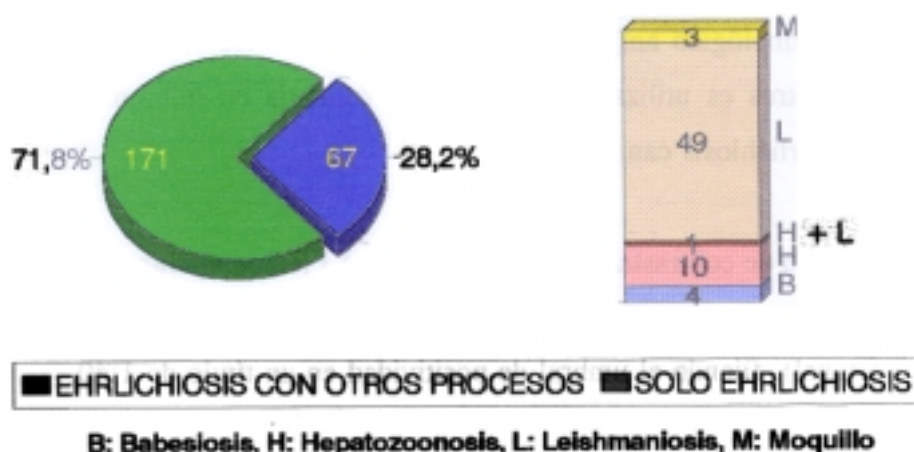
4.2.1. CONCURRENCIA DE EHRLICHIOSIS CON OTROS PROCESOS PATOLOGICOS

Los criterios de inclusión de perros en el estudio clínico nos han llevado a descartar algunos casos en los que, junto a la ehrlichiosis, se presentaba de un modo concurrente algún otro proceso patológico. En nuestro estudio hemos encontrado un

RESULTADOS

total de 67 animales con concurrencias, que respecto a los 171 incluidos, representa un 28.2% del total. Por ello, previamente, describiremos con brevedad la casuística encontrada en este sentido (fig.1).

FIG.1. CONCURRENCIA EHRLICHIOSIS CON OTROS PROCESOS PATOLOGICOS
(n = 238 casos)



Sin duda alguna, el proceso con el que más habitualmente nos hemos encontrado asociada la ehrlichiosis ha sido la leishmaniosis canina; en concreto, hemos hallado 49 casos de concurrencia entre ambas patologías.

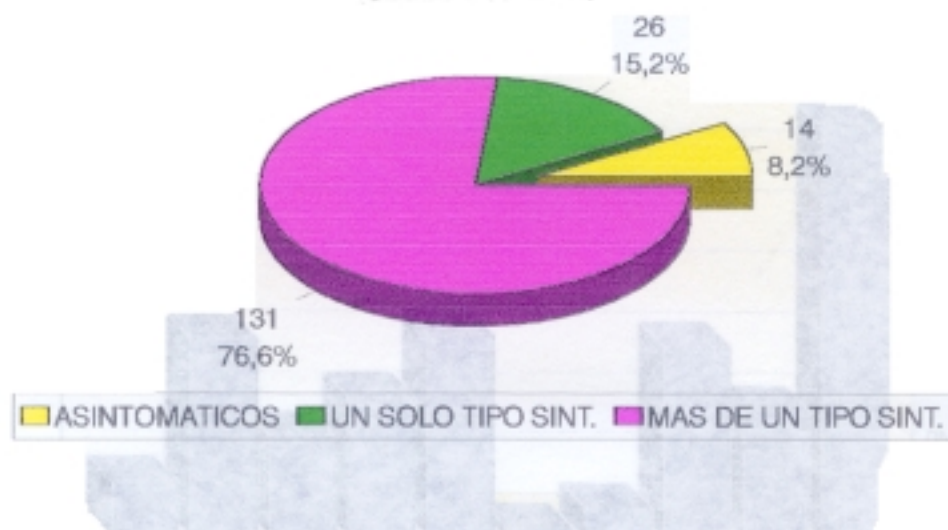
Además hemos diagnosticado, aunque con una menor frecuencia, ehrlichiosis asociada a hepatozoonosis en 10 perros, a babesiosis en 4 y a moquillo en 3. También queremos dejar constancia de la presencia, en un mismo perro, de ehrlichiosis, leishmaniosis y hepatozoonosis.

4.2.2. FRECUENCIA DE PRESENTACION DE LOS DISTINTOS SINTOMAS OBSERVADOS EN PERROS DIAGNOSTICADOS DE EHRLICHIOSIS CANINA

Como ya hemos comentado en el apartado de materiales y métodos, nuestra colección de datos para este estudio clínico está recogida a partir de las historias clínicas de 171 perros diagnosticados de ehrlichiosis. Tras la realización de una exhaustiva y detallada exploración, hemos confirmado la existencia de un elevado y variable número de manifestaciones clínicas, con distintos grados de intensidad, en el curso de esta enfermedad.

Del total de la población estudiada, hemos encontrado 157 casos (91.82 %) que presentaban sintomatología clínica, mientras que tan sólo 14 (8.18 %) de ellos eran asintomáticos (fig.2).

Fig.2. CUADRO CLINICO EHRLICHIOSIS CANINA
(n = 171 casos)

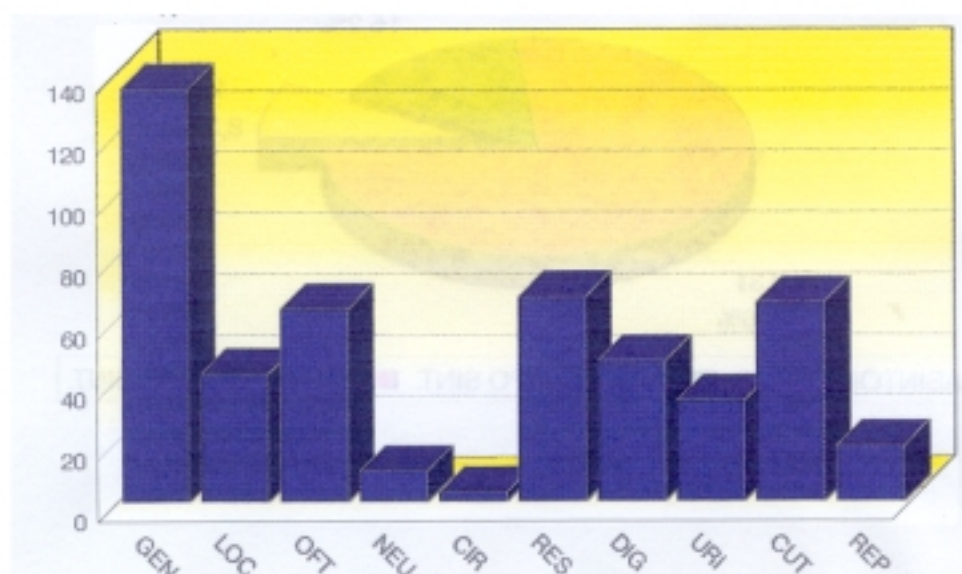


RESULTADOS

Entre aquellos perros que presentaban un cuadro clínico, se han recogido más de 50 síntomas diferentes, los cuales se han clasificado para su análisis en 10 grupos. Lógicamente hemos encontrado casos que presentaban síntomas de más de uno de estos grupos (fig.3). Las frecuencias absolutas y relativas para cada uno de estos grupos fueron las siguientes:

1. Síntomas generales: 78.95 % (135 casos).
2. Síntomas del aparato locomotor: 24.56 % (42 casos).
3. Síntomas oftalmológicos: 36.84 % (63 casos).
4. Síntomas neurológicos: 5.85 % (10 casos).
5. Síntomas del aparato circulatorio: 1.75 % (3 casos).
6. Síntomas del aparato respiratorio: 39.18 % (67 casos).
7. Síntomas digestivos: 26.90 % (46 casos).
8. Síntomas del aparato urinario: 19.30 % (33 casos).
9. Síntomas cutáneos: 38.01 % (65 casos).
10. Síntomas del aparato reproductor: 10.53 % (18 casos).

**Fig.3. DISTRIBUCION SEGUN TIPO DE SINTOMAS
(n= 171 casos)**



A continuación pasamos a desglosar las diferentes manifestaciones clínicas detectadas dentro de cada grupo describiendo, en algunos casos, ciertas peculiaridades de las mismas.

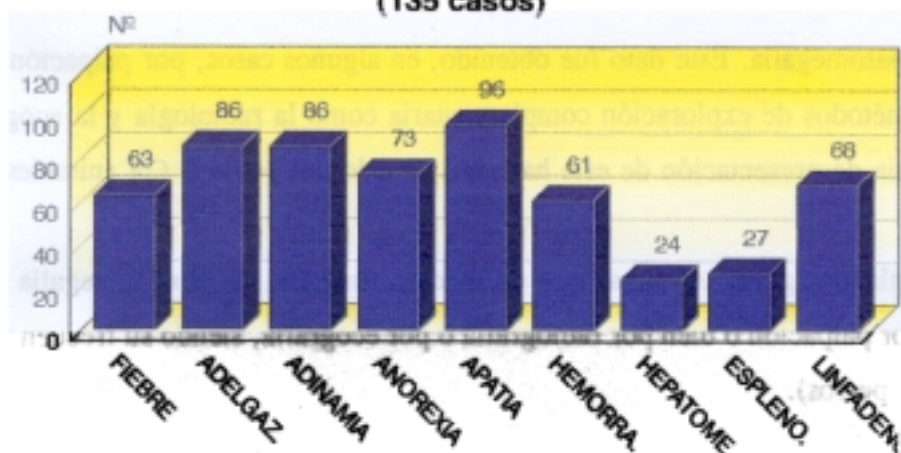
SINTOMAS GENERALES

Entre los síntomas clasificados como generales (fig.4), hemos encontrado:

- fiebre. Su frecuencia de presentación ha sido del 36.84 % (63 casos). La fiebre se caracterizaba por ser persistente; en algunos casos (en concreto, en 14), al detectarse un síndrome febril, los animales habían sido tratados con un antibiótico de amplio espectro (amoxicilina) pese a lo cual la fiebre no había remitido. Dos animales, en el momento de la exploración, presentaban hipotermia.

- adelgazamiento, con una frecuencia del 50.29 % (86 casos). Esta pérdida de peso fue ligera en 22 animales, llegándose al estado de caquexia en 6 perros. Tres individuos asintomáticos, no sólo no habían adelgazado sino que, incluso, habían engordado.

Fig.4. SINTOMAS GENERALES
(135 casos)



RESULTADOS

- adinamia, con una frecuencia del 50.29% (86 casos). Esta se ha presentado tanto en razas habitualmente empleadas para la caza o la guarda como en razas de compañía.

- anorexia, en el 42.69% de los perros (73 casos). En ocasiones, no se trataba estrictamente de perros anoréxicos sino de individuos con apetito caprichoso.

- apatía, presente en el 56.14% de los animales (96 casos). Este signo ha sido uno de los primeros en ser observado por el dueño manifestándose, frecuentemente, como un cambio en el comportamiento habitual del perro como, por ejemplo, que no ladrara como antes o que se mostrara menos agresivo.

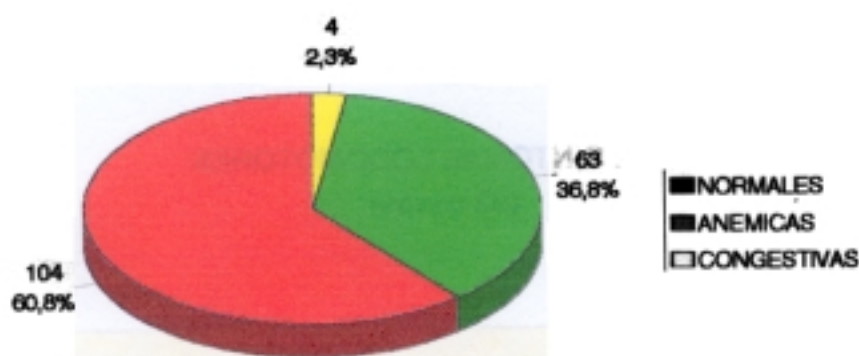
- hemorragias, con una frecuencia del 35.67% (61 casos). De los 61 animales incluidos en este apartado, 41 presentaron epistaxis, siendo unilateral en 12 casos y bilateral en 29. Una vez realizada la exploración completa, en algunos casos se detectaron otros síntomas de tipo hemorrágico que, en función de su localización, aparecen integrados en los diferentes grupos sintomáticos topográficos. No obstante y con el fin de unificar todos estos signos, al final de este capítulo hemos incluido un apartado de síntomas hemorrágicos en el que se detalla la frecuencia de presentación de cada uno de ellos.

- hepatomegalia. Este dato fue obtenido, en algunos casos, por palpación y, en otros, por métodos de exploración complementaria como la radiología y la ecografía. La frecuencia de presentación de este hallazgo ha sido del 14.04% (24 animales).

- esplenomegalia. Al igual que en el caso anterior, la esplenomegalia se ha detectado por palpación o bien por radiografía o por ecografía, siendo su frecuencia del 15.79% (27 perros).

- mucosas. La exploración de mucosas se incluyó en este estudio debido a la relativa frecuencia con la que aparecen anemias en el curso de la ehrlichiosis canina (fig.5). El 50.82% (104 perros) presentaba unas mucosas aparentemente normales, mientras que en un 36.84% de los casos (63 perros) éstas eran anémicas y tan sólo en un 2.34% (4 animales) eran congestivas.

Fig.5. COLORACION MUCOSAS
(n = 171 casos)



- linfadenomegalia. Esta alteración se ha detectado por palpación de los ganglios linfáticos mandibulares, preescapulares y poplíteos. La frecuencia con que aparecía linfadenomegalia fue del 39.77% si bien, en 32 de los 68 casos en los que se observó, este proceso no afectaba a todos los ganglios explorados sino sólo a algunos de ellos.

SINTOMAS LOCOMOTORES

En este apartado hemos incluido estas manifestaciones (fig.6):

- cojeras. En perros con ehrlichiosis, encontramos cojeras en el 18.71% (32 casos) del total de los animales estudiados. Las cojeras eran intermitentes, afectando tanto a las extremidades anteriores como a las posteriores

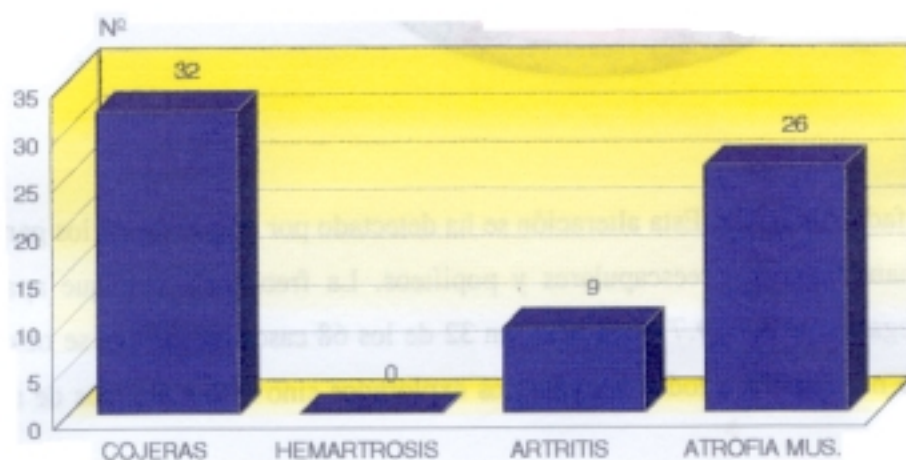
RESULTADOS

- hemartrosis. En nuestro estudio no hemos logrado detectar ningún perro con hemartrosis.

- artritis. Un total de 9 perros presentaron cuadros de artritis, lo que supone una frecuencia del 5.26%; en 6 de los casos descritos observamos monoartritis y en 3, poliartritis.

- atrofia muscular, en un 15.20% de los casos (26 animales). La atrofia muscular, en todos los casos, era generalizada.

**Fig.6. SINTOMAS LOCOMOTORES
(42 casos)**



SINTOMAS OFTALMOLOGICOS

Los síntomas oftalmológicos encontrados en nuestro estudio han sido (fig.7):

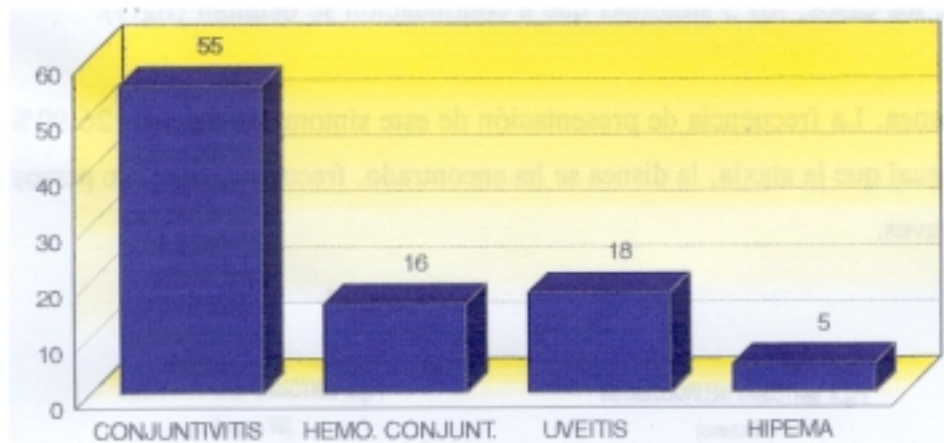
- conjuntivitis. La frecuencia de presentación de este proceso ha sido del 32.16% (55 casos); en algunos casos, también se observaron infecciones secundarias.

- hemorragias conjuntivales. Un 9.36% de los perros objeto de estudio (16 animales) mostraron esta sintomatología.

- uveitis anterior. El 10.53% de los animales (18 casos) presentaba uveitis anterior. El diagnóstico de este proceso se realizó por oftalmoscopia o con lámpara de hendidura. Esta uveitis fue bilateral en todos los perros, salvo en 2. En 3 animales se diagnosticó una panuveitis.

- hipema, con una frecuencia del 2.92% (5 casos). Tanto este dato como el relativo a las hemorragias conjuntivales será valorado más adelante junto al resto de sintomatología hemorrágica.

Fig.7. SINTOMAS OFTALMOLOGICOS
(63 casos)



SINTOMAS NEUROLÓGICOS

En líneas generales, el cuadro neurológico no se ha presentado frecuentemente en perros con ehrlichiosis (fig.8). Los síntomas apreciados han sido los siguientes:

- convulsiones. La presentación de síndromes convulsivos se ha restringido a 4

RESULTADOS

casos, lo que supone un 2.34% de la población estudiada.

- ataxia. La ataxia se ha detectado en el 5.26% de los perros (9 casos).
Prácticamente la totalidad de los individuos atáxicos tenían anemias severas.

SINTOMAS CARDIACOS

No hemos observado alteraciones cardiacas reseñables en los perros incluidos en este estudio; únicamente hemos apreciado taquicardia sinusal en 3 perros con anemia severa.

SINTOMAS RESPIRATORIOS

Los perros con sintomatología respiratoria mostraban, simultáneamente, en la mayoría de los casos, los 3 síntomas que a continuación se detallan (fig.9):

- disnea. La frecuencia de presentación de este síntoma ha sido del 26.90% (46 casos); al igual que la ataxia, la disnea se ha encontrado, frecuentemente, en perros con anemias graves.

Fig.8. SINTOMAS NEURÓLOGICOS
(10 casos)

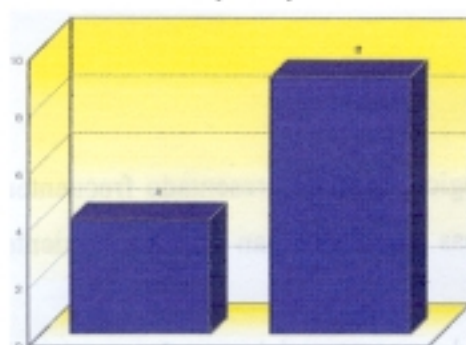
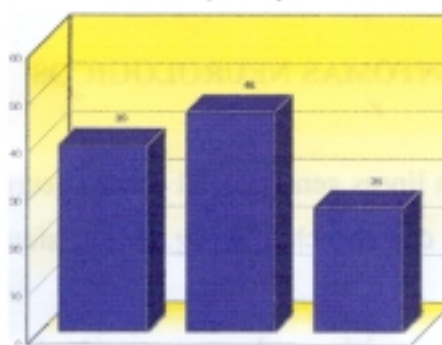


Fig.9. SINTOMAS RESPIRATORIOS
(57 casos)



- secreción nasal (rinorrea). El porcentaje de perros con este síntoma fue del 22.81 % (39 casos). La secreción era de tipo mucopurulento y, menos frecuentemente, de tipo seroso. Tanto en un caso como en otro, esta misma secreción aparecía también a nivel ocular. De este grupo se descartaron aquellos animales que presentaban epistaxis.

- tos. El 15.2% de los casos (un total de 26) presentaban cuadros de tos, frecuentemente productiva. En 4 perros se llevó a cabo un estudio radiológico de la cavidad torácica evidenciándose un cuadro de neumonía localizada, fundamentalmente, en los lóbulos diafragmáticos y accesorio.

SINTOMAS DIGESTIVOS

Los síntomas digestivos que hemos encontrado en perros con ehrlichiosis son (fig.10):

- vómitos. Su frecuencia de presentación fue del 10.53% (18 casos). Los vómitos descritos eran tanto de tipo biliar como con contenido alimenticio. No hemos encontrado, en nuestra población, ningún caso de hematemesis.

- diarrea, en un 16.37% de perros, es decir, en 28 casos. Hemos detectado diarrea de intestino delgado y/o de intestino grueso, en su mayoría, de presentación aguda. Sin embargo, también hemos visto algún caso aislado de ehrlichiosis asociada a diarrea crónica de intestino grueso compatible con un cuadro de colitis linfoplasmocitaria.

- hematoquezia. La frecuencia de presentación de este hallazgo ha sido del 10.53% (18 perros). Se han observado casos con sangre fresca en heces y/o de sangre digerida.

RESULTADOS

ig.10. SINTOMAS DIGESTIVOS
(46 casos)

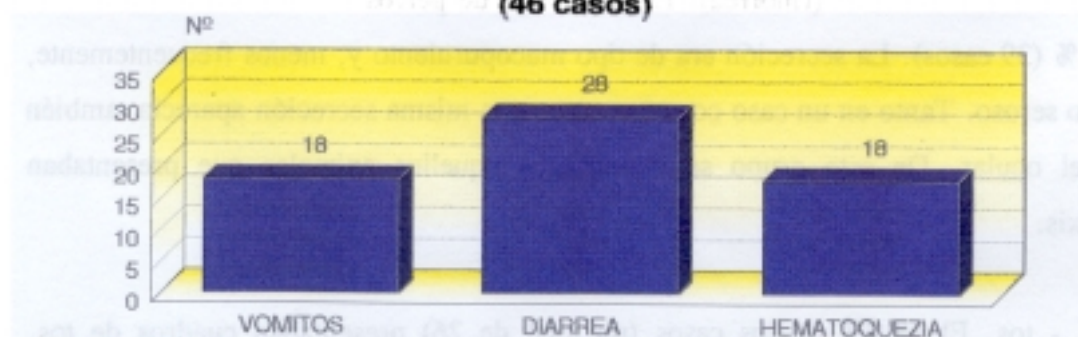
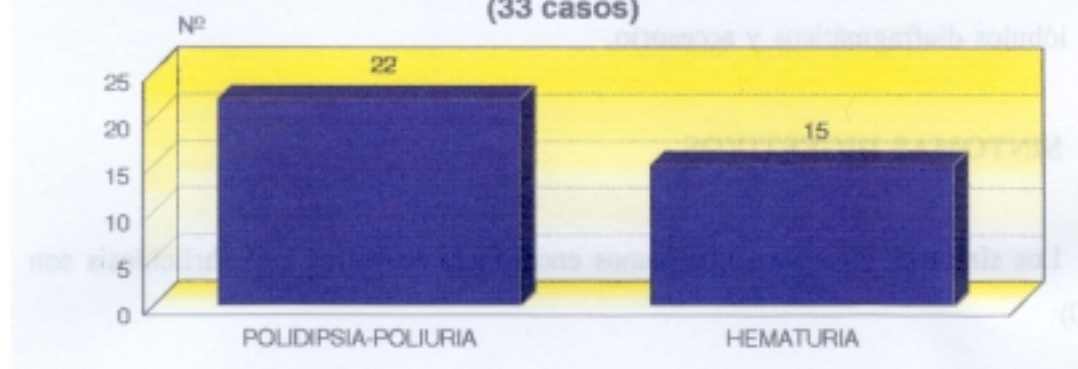


Fig.11. SINTOMAS APARATO URINARIO
(33 casos)



SINTOMAS URINARIOS

En este grupo hemos observado (fig.11):

- hematuria. En este apartado hemos incluido sólo a aquellos animales que presentaban un cuadro de hematuria identificada macroscópicamente por lo que, en realidad, este dato podría ser superior al obtenido por nosotros en este estudio. Encontramos hematuria en el 8.77% (15 casos).

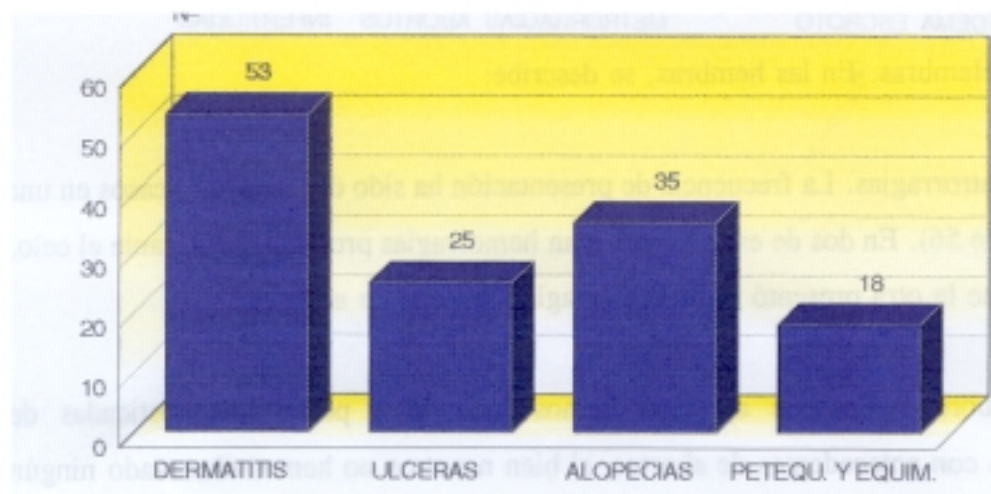
- polidipsia/poliuria. Este síndrome se registró en 22 ocasiones, lo que supone una frecuencia relativa del 12.87%. La mayoría de estos casos, con la ayuda de técnicas biopatológicas, fueron diagnosticados como cuadros de insuficiencia renal.

SINTOMAS CUTANEOS

La sintomatología cutánea ha mostrado la siguiente distribución (fig.12):

- dermatitis. Se han detectado procesos inflamatorios a nivel de piel en un 30.99% de los casos (53 perros). Fundamentalmente observamos lesiones similares a las encontradas en estados de hipersensibilidad.
- úlceras. Un 14.62% (25 animales) de los perros estudiados mostraban esta sintomatología. En algunos casos, éstas eran debidas a decúbito prolongado.
- alopecias. Un 20.47% de los perros (35 animales) presentaron alopecias.
- petequias y equimosis. El 10.53% de los casos (un total de 18) tenían estas lesiones, en número variable y en diferentes zonas, destacando la región ventral y la cara interna de las extremidades posteriores; también se han detectado en la mucosa oral y prepucial.

Fig.12. SINTOMAS CUTANEOS
(65 casos)

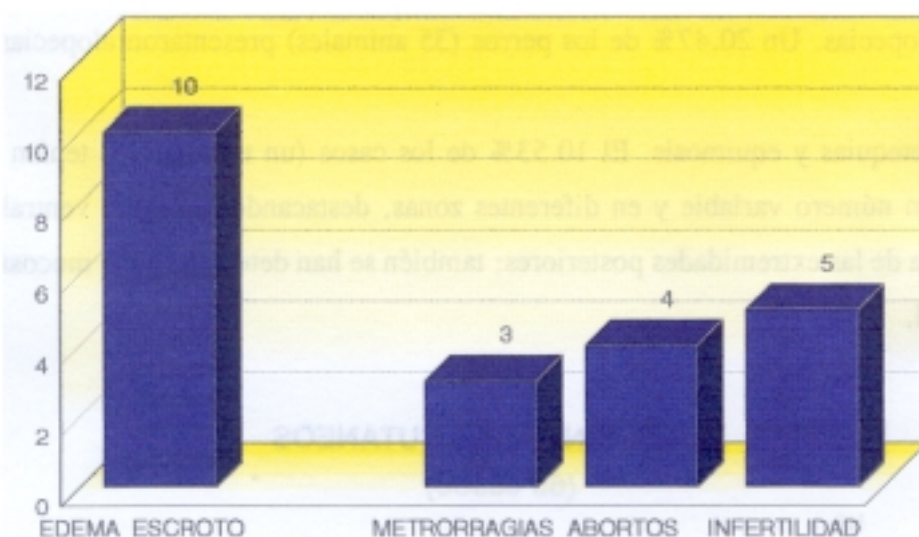


SINTOMAS DEL APARATO REPRODUCTOR

Lógicamente, en este apartado la población estudiada se ha dividido en 2 subpoblaciones (machos y hembras), cada una de las cuales presenta un cuadro diferente (fig.13):

A) Machos. La sintomatología encontrada en los machos se limita a la aparición de edema de escroto en un 8.7% de los perros (10 casos en una población de 115).

Fig.13. SINTOMAS DEL APARATO REPRODUCTOR
(Machos = 115 Hembras = 56)
(18 casos)



B) Hembras. En las hembras, se describe:

- metrorragias. La frecuencia de presentación ha sido del 5.36% (3 casos en una población de 56). En dos de estas perras eran hemorragias prolongadas durante el celo, mientras que la otra presentó estas hemorragias después de un parto.

abortos. En este apartado hemos incluido a perras diagnosticadas de ehrlichiosis con antecedentes de abortos, si bien nosotros no hemos observado ningún

caso de aborto en perras con esta enfermedad. Con esta salvedad, la frecuencia relativa también ha sido del 5.36% (4 casos).

- infertilidad. Este grupo engloba a aquellas hembras que han sido cruzadas varias veces sin éxito alguno, presentando una edad propicia para la gestación. En esta situación hemos encontrado 5 casos (8,93 % del total de hembras).

SINTOMAS HEMORRAGICOS

A continuación, y debido a su importancia desde un punto de vista clínico, pasamos a enumerar los síntomas de tipo hemorrágico encontrados en perros con ehrlichiosis y sus frecuencias; algunos de estos datos ya han sido comentados en otros grupos sintomáticos.

El porcentaje total de perros con cuadros de este tipo supone el 35,67% (61 animales). Teniendo en cuenta que algunos de ellos presentaban más de uno de los síntomas englobados en este apartado, la distribución de éstos ha sido:

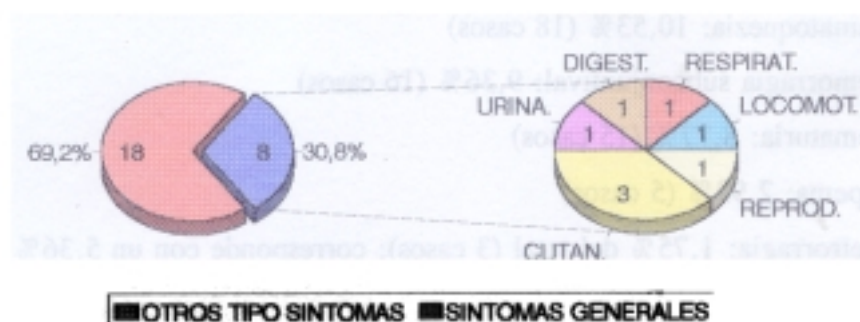
- epistaxis: 23,98 % (41 casos)
- petequias y equimosis: 10,53% (18 casos)
- hematoquezia: 10,53% (18 casos)
- hemorragia subconjuntival: 9,36% (16 casos)
- hematuria: 8,77% (15 casos)
- hipema: 2,92 % (5 casos)
- metrorragia: 1,75 % del total (3 casos); corresponde con un 5,36% de las hembras.
- hemorragia gingival: 1,75 % (3 casos).

RESULTADOS

4.2.3. ASOCIACIONES ENCONTRADAS ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS SINTOMATICOS

En este apartado hemos incluido el estudio realizado con los diferentes grupos de síntomas, intentando buscar la existencia de asociaciones entre ellos. Previamente indicaremos que, tan sólo, 26 de los 157 perros con cuadro clínico (es decir un 16,56% de ellos) presentaron síntomas de un único grupo de los establecidos. La distribución de estos casos aparece en la figura 14.

Fig.14. CUADROS CLINICOS CON UN SOLO TIPO DE SINTOMAS
(n = 26 casos)



La distribución de las distintas asociaciones y su estudio estadístico, mediante el test de la χ^2 , muestran la existencia de relaciones significativas entre algunas de ellas, tal y como se recoge en la siguiente tabla:

	GENERAL	LOCOM	OCULAR	NEU	CIRCU	RESPIR	DIGEST	URIN	CUTAN	REPRO
GEN	-	NO	SI $p < 0.05$	NO	NO	SI $p < 0.01$	SI $p < 0.01$	SI $p < 0.05$	NO	NO
LOC	NO	-	SI $p < 0.01$	NO	NO	NO	NO	SI $p < 0.05$	SI $p < 0.01$	NO
OCU	SI	SI	-	NO	NO	SI $p < 0.001$	NO	SI $p < 0.01$	SI $p < 0.05$	NO
NEU	NO	NO	NO	-	NO	casi $p < 0.1$	NO	NO	NO	NO
CIR	NO	NO	NO	NO	-	NO	NO	NO	NO	NO
RES	SI	NO	SI	casi	NO	-	SI $p < 0.01$	SI $p < 0.001$	NO	casi $p < 0.05$
DIG	SI	NO	NO	NO	NO	SI	-	NO	NO	NO
URI	SI	SI	SI	NO	NO	SI	NO	-	NO	SI $p < 0.05$
CUT	NO	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO	-	SI $p < 0.001$
REP	NO	NO	NO	NO	NO	casi	NO	SI	SI	-

El número de perros estudiados con más de un tipo de sintomatología fue de 131 (es decir, un 83,43% de los casos sintomáticos); diferenciaremos para su estudio 2 subgrupos: uno de perros con síntomas generales y otro de perros sin síntomas generales.

A) Perros con síntomas generales. Un total de 117 casos presentaron síntomas generales asociados desde a 1 hasta a 7 tipos de grupos sintomáticos distintos. La distribución de las diferentes asociaciones aparece en las 2 tablas siguientes:

RESULTADOS

RESPIRATORIOS	CUTANEOS	OCULARES	LOCOMOTORES	DIGESTIVOS	URINARIOS	
SI 61	SI 23	SI 18	SI 10	SI 3	SI 3	
				NO 7	NO 0	
					SI 4	
			NO 8	NO 3		
				SI 3	SI 1	
				NO 2		
		NO 5	SI 1			
			NO 4			
			NO 5	SI 0	SI 0	
		NO 1		NO 0		
				SI 0		
		NO 4		NO 1		
				SI 1	SI 1	
				NO 0		
			NO 3	SI 1		
				NO 2		
				NO 38	SI 18	SI 2
		NO 2				
	NO 3	SI 3				
	NO 0					
	NO 13	SI 7	SI 2			
		NO 5				
		NO 6	SI 1			
			NO 5			
	NO 20	SI 3	SI 1		SI 0	
			NO 1			
			SI 0			
		NO 17	NO 2	NO 2		
			SI 10	SI 3		
			NO 7	NO 7		
		SI 1				
		NO 6				

RESULTADOS

RESPIRATORIOS	CUTANEOS	OCULARES	LOCOMOTORES	DIGESTIVOS	URINARIOS	
NO 74	SI 28	SI 9	SI 5	SI 1	SI 0	
					NO 1	
			NO 4	NO 4	SI 2	
					NO 2	
				SI 1	SI 1	
				NO 3	NO 0	
		NO 19	SI 5		SI 0	
					NO 3	
				SI 2	SI 0	
					NO 2	
			NO 14	NO 3	SI 0	
					NO 3	
		NO 46	SI 11	NO 14	SI 0	SI 0
						NO 0
					NO 14	SI 0
						NO 14
				SI 0	SI 0	SI 0
						NO 0
	NO 0				SI 0	
					NO 0	
	NO 11			SI 3	SI 1	
					NO 2	
				NO 8	SI 2	
					NO 6	
	NO 35		SI 8	SI 3	SI 0	
					NO 3	
		NO 5		SI 2		
				NO 3		
		NO 27	SI 6	SI 1		
				NO 5		
			NO 21	SI 1		
				NO 20		

B) Perros sin síntomas generales. Un total de 14 casos presentaron, sin tener síntomas generales, asociación entre 2, 3 e incluso 4 grupos de síntomas. La sintomatología predominante en estos casos fue la cutánea (11 casos), la cual se encontró asociada fundamentalmente a patologías oculares (5 casos) y, en menor medida, a trastornos respiratorios (2 casos), digestivos (también 2), locomotores (1) y reproductores (1). Los 3 casos restantes mostraron síntomas respiratorios asociados, en 2 de ellos, a síntomas oculares y, en uno, a síntomas del aparato urinario.

4.2.4.ASOCIACIONES ENTRE LA SINTOMATOLOGIA Y OTROS FACTORES

En este apartado incluimos la información recogida al tratar de comprobar la posible relación entre la sintomatología encontrada y diferentes factores individuales como la raza, la edad y el sexo. También hemos querido incluir, en este estudio, el título de anticuerpos encontrado en el momento del diagnóstico; este parámetro puede orientarnos acerca de la fase de la enfermedad en la que se sitúa cada caso clínico.

Para el análisis del título de anticuerpos, hemos confeccionado los siguientes grupos obteniendo, en cada caso, la frecuencia que a continuación se detalla:

- bajo: hasta 1/320: 8 casos
- medio: entre 1/640-1/1280: 14 casos
- medio-alto: 1/2560: 33 casos
- alto: 1/5120: 35 casos
- muy alto: 1/10240: 81 casos

En la raza se han considerado 3 grandes grupos (pastores alemanes, mestizos y otras razas) y en cuanto a la edad, se ha considerado la siguiente clasificación: hasta los 2 años, 3-4, 5-6, 7-8, 9-10 y mayores de 10 años.

En el estudio estadístico, mediante el test de la χ^2 , de todas las posibles asociaciones de grupos sintomáticos y síntomas concretos con los factores considerados, tan sólo describiremos aquellos que consideramos más relevantes, por presentarse entre ellos una relación significativa.

a) Asociación entre síntomas y raza. No se ha encontrado relación significativa alguna.

b) Asociación entre síntomas y sexo. Tras el estudio estadístico se han encontrado las siguientes relaciones:

- relación casi significativa ($p < 0.1$) entre sintomatología oftalmológica y machos.
- relación casi significativa ($p < 0.1$) entre uveitis y machos.
- relación casi significativa ($p < 0.1$) entre hemorragias y machos.
- relación significativa ($p < 0.05$) entre convulsiones y hembras.

c) Asociación entre síntomas y edad. Hemos observado las siguientes asociaciones:

- relación casi significativa ($p < 0.1$) entre síntomas generales y edad comprendida entre los 0 y 2 años.
- relación casi significativa ($p < 0.1$) entre anorexia y edades comprendidas entre los 0 y los 2 años.
- relación significativa ($p < 0.05$) entre adelgazamiento y edades comprendidas entre los 0 y los 2 años.
- relación significativa ($p < 0.05$) entre convulsiones y edades comprendidas entre los 5 y los 6 años.

d) Asociación entre síntomas y título de anticuerpos. Se han encontrado las siguientes asociaciones:

- relación significativa ($p < 0.001$) entre ausencia de síntomas y títulos altos y muy altos.
- relación significativa ($p < 0.001$) entre síntomas neurológicos y títulos bajos y medios.
- relación significativa ($p < 0.001$) entre ataxia y títulos bajos y medios.
- relación significativa ($p < 0.05$) entre atrofia muscular y títulos medios.
- relación significativa ($p < 0.01$) entre esplenomegalia y títulos muy altos.
- relación significativa ($p < 0.05$) entre metrorragia y títulos altos.
- relación casi significativa ($p < 0.1$) entre abortos y títulos altos.
- relación casi significativa ($p < 0.1$) entre petequias y títulos muy altos.
- relación casi significativa ($p < 0.1$) entre hemorragias y títulos muy altos.

4.3. ESTUDIO BIOPATOLOGICO

Para el estudio biopatológico de la ehrlichiosis canina, se han utilizado los valores de los distintos parámetros laboratoriales de los 93 casos de nuestro ensayo terapéutico, obtenidos en el momento del diagnóstico.

4.3.1. HEMATOLOGIA

Los resultados de la estadística básica de valores hematológicos se recogen en la siguiente tabla:

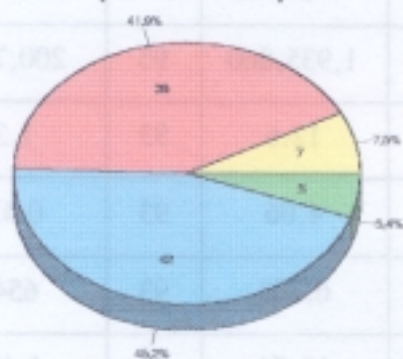
Parámetro estudiado	Media	Desviación típica	n	Error Standard	valor mínimo	valor máximo
GR/mm ³	5,579,226	1,935,860	93	200,739	1,080,000	12,560,000
Hto (%)	39.1	12.6	93	1.3	11.0	69.5
Hb (g/dl)	12.85	4.06	93	0.42	3.30	25.20
GB/mm ³	11,154	6,305	93	654	1,200	36,400
Neu(%)	64.59	13.74	93	1.42	32	88
Lin(%)	30.33	13.29	93	1.39	2	62
Eos(%)	2.23	3.24	93	0.34	0	24
Mon(%)	2.68	3.78	93	0.39	0	18
Bas(%)	0	0	93	0	0	0
Plaq/mm ³	95,150	81,702	93	8,472	5,000	528,000

Los valores hematológicos de referencia fueron tomados de Schalm y colaboradores (Schalm et al, 1975). De acuerdo con dichos valores, los resultados obtenidos se clasificaron en 3 grupos (inferior, superior y dentro del rango fisiológico); tanto en el hematocrito y la hemoglobina como en los recuentos de glóbulos rojos y plaquetas se han considerado, con una finalidad clínica, cuatro grupos, en lugar de tres, tras subdividir los valores inferiores a lo normal en dos clases.

La distribución de frecuencias absolutas y relativas obtenidas para cada parámetro aparece reflejada en las figuras 15-20.

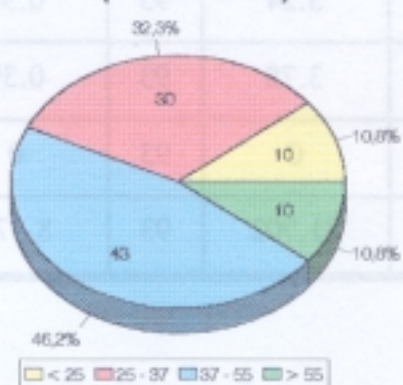
RESULTADOS

RECuento GLOBULOS ROJOS (n = 93 casos)



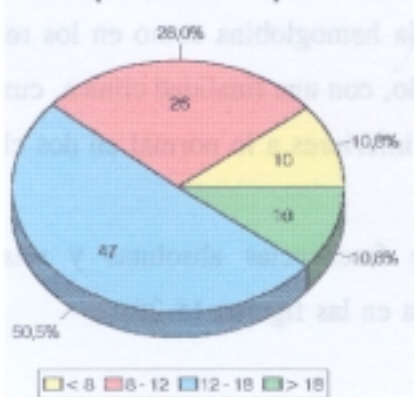
millones / milímetro cúbico

HEMATOCRITO (n = 93 casos)



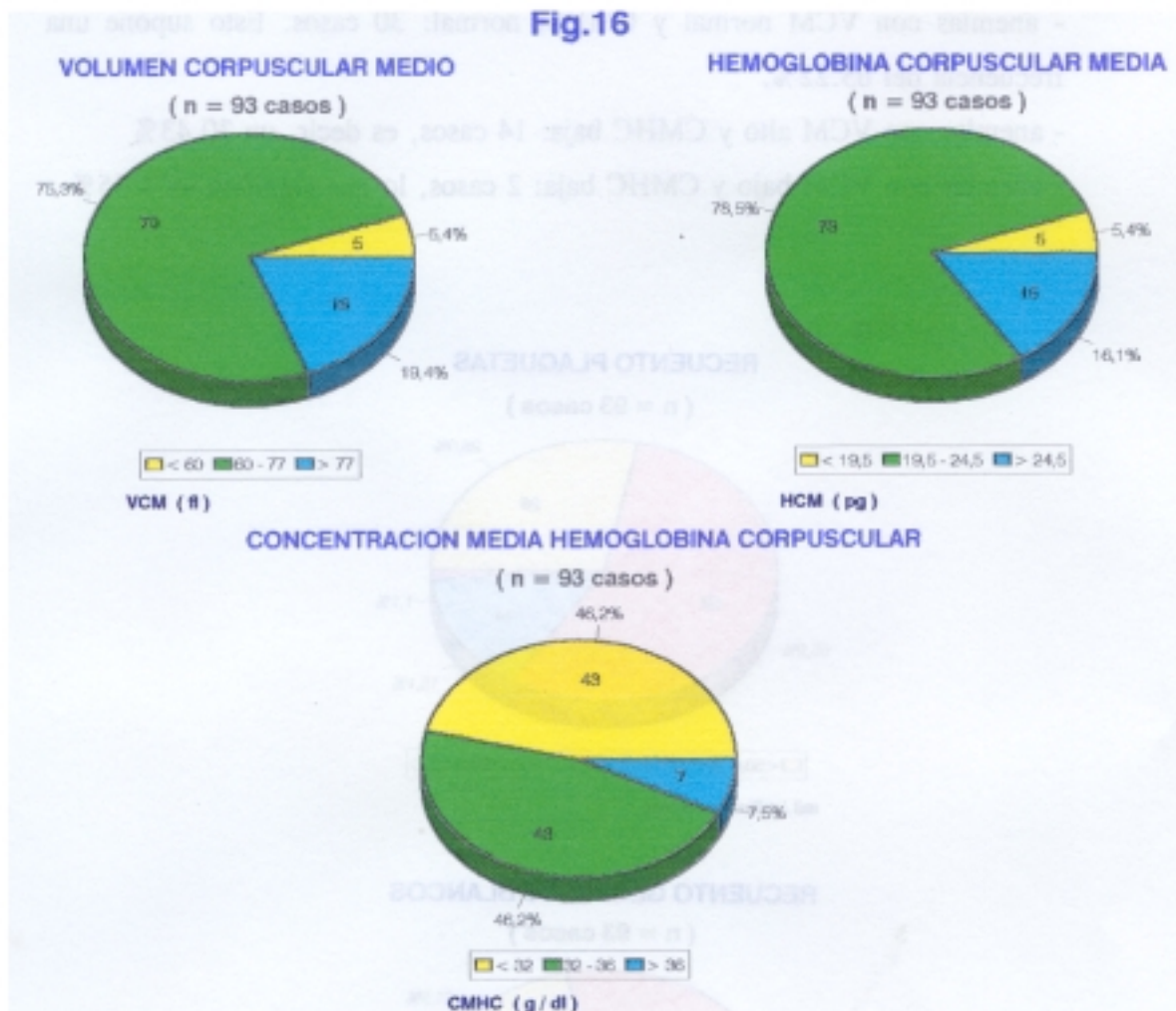
(%)

HEMOGLOBINA (n = 93 casos)



(g/dl)

Fig.16



RESULTADOS

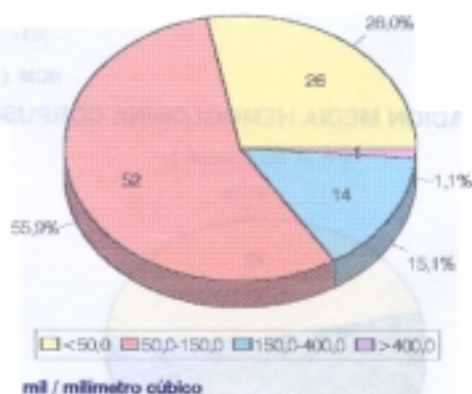
El VCM y la CMHC pueden emplearse para clasificar los diferentes tipos de anemia (Tvedten, 1994). Siguiendo este criterio hemos estudiado, en los 46 casos con recuentos eritrocitarios inferiores a $5.5 \times 10^6/\text{mm}^3$, las posibles combinaciones de VCM y CMHC, encontrando las 3 siguientes:

- anemias con VCM normal y CMHC normal: 30 casos. Esto supone una frecuencia del 65.22%.
- anemias con VCM alto y CMHC baja: 14 casos, es decir, un 30.43%
- anemias con VCM bajo y CMHC baja: 2 casos, lo que significa un 4.35%

Fig.17

RECuento PLAQUETAS

(n = 93 casos)



RECuento GLOBULOS BLANCOS

(n = 93 casos)

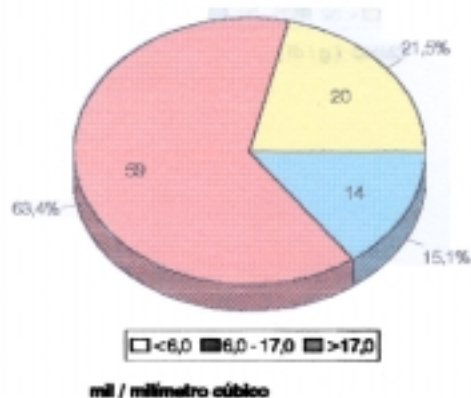
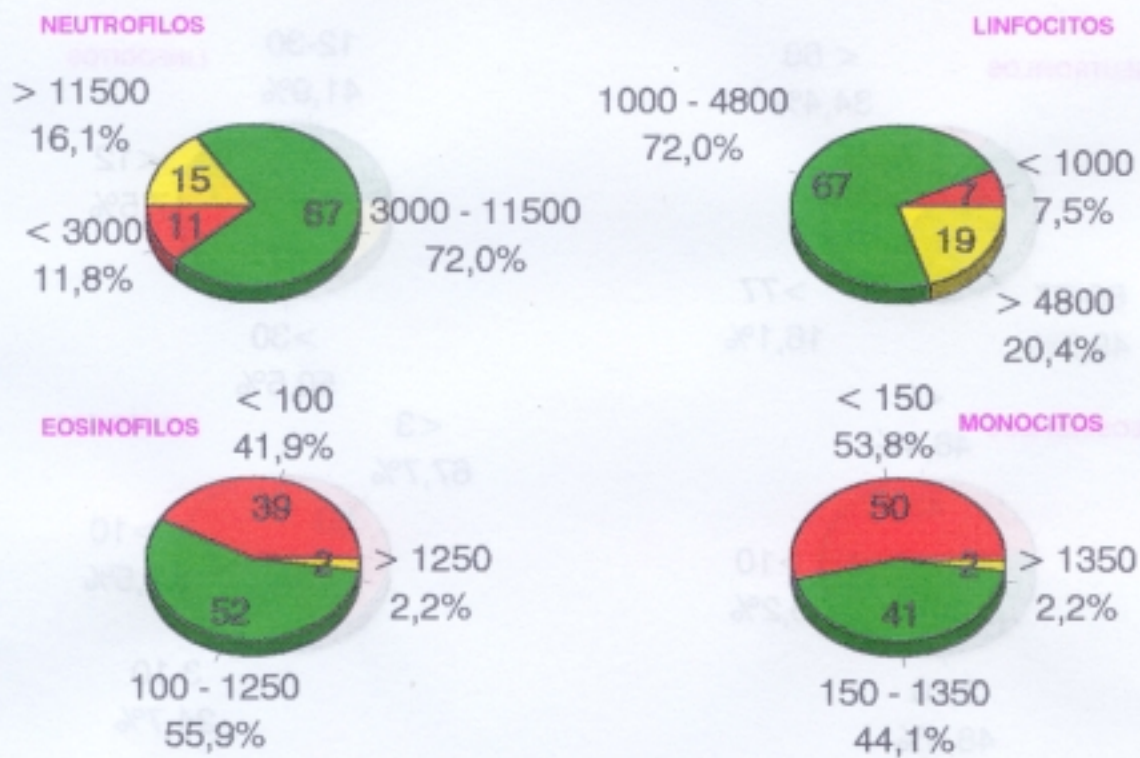
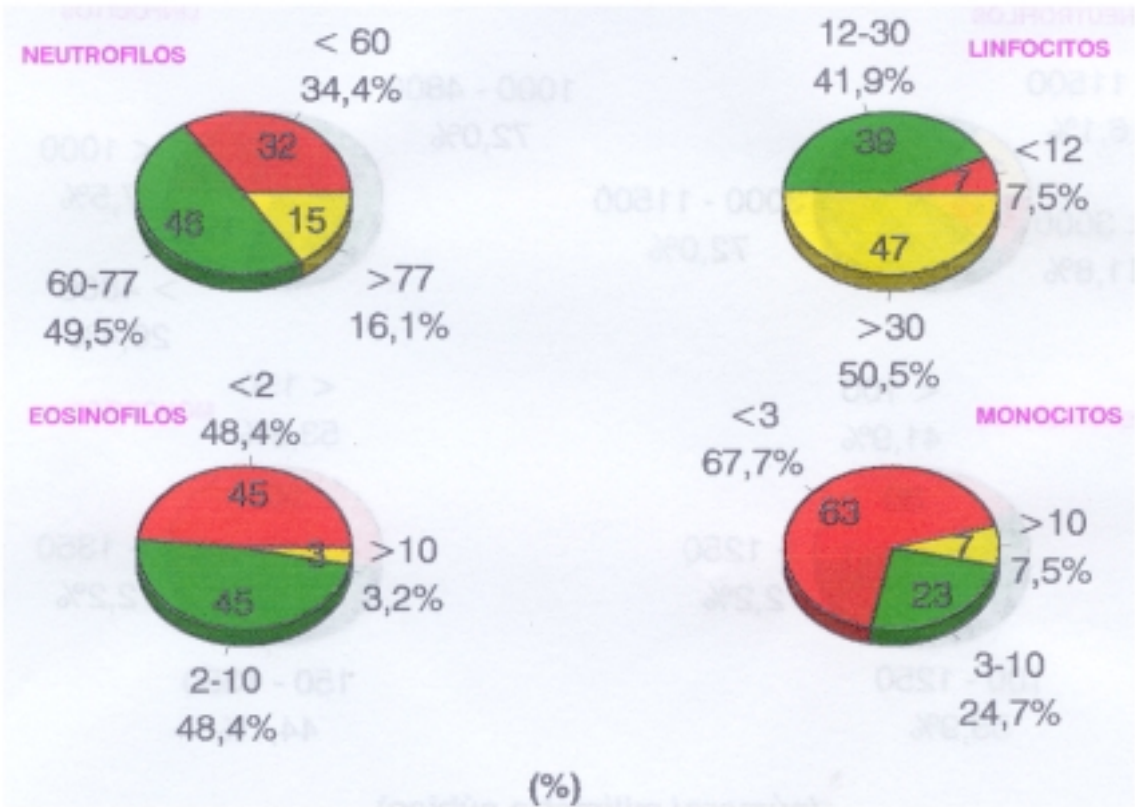


Fig. 18. FORMULA LEUCOCITARIA: VALORES ABSOLUTOS
(n = 93 casos)



(número/ milímetro cúbico)

Fig.19. FORMULA LEUCOCITARIA: VALORES RELATIVOS
(n = 93 casos)



En los casos en los que los recuentos celulares mostraban valores inferiores a los fisiológicos, hemos estudiado la frecuencia de presentación de pancitopenia y de las diferentes bicitopenias (Fig.20). Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

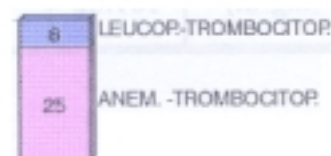
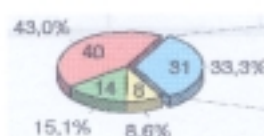
- pancitopenia: 14 casos (15.05 % del total).
- bicitopenias:
 - * anemia y trombocitopenia (sin leucopenia): 25 casos (26.88%).
 - * anemia y leucopenia (sin trombocitopenia): 0 casos.
 - * leucopenia y trombocitopenia (sin anemia): 6 casos (6.45 %).

También detallamos a continuación aquellos análisis en los que únicamente se presenta una citopenia aislada:

- anemia: 7 casos (7.52 %).
- leucopenia: 0 casos.
- trombocitopenia: 33 casos (35.48 %).

Tan sólo en 8 casos (8.60%), los valores de las tres series eran totalmente normales.

Fig.20. ASOCIACION VALORES RECuentOS CELULAS SANGUINEAS
(n = 93 casos)



■ BICITOPE, ■ CITOPE AISL., ■ PANCITOPE, □ RECUEENT. NORMALES.

4.3.2. BIOQUIMICA SANGUINEA

La estadística básica de los parámetros bioquímicos valorados en nuestro estudio se recogen en la siguiente tabla:

Parámetro estudiado	Media	Desviación típica	n	Error Standard	Valor mínimo	Valor máximo
Proteínas(g/dl)	9.05	1.71	93	0.18	4.2	14.4
Alb (g/dl)	2.65	0.71	93	0.07	1.0	4.22
Alfa (g/dl)	0.91	0.28	93	0.03	0.32	1.90
Beta (g/dl)	2.03	0.62	93	0.06	0.7	3.52
Gamma (g/dl)	3.45	1.69	93	0.18	0.66	9.90
Alb/Glo	0.45	0.20	93	0.02	0.1	1.1
GPT (U/L)	36.32	34.51	93	3.58	9.0	261
Bilirrubina (mg/dl)	0.70	0.37	93	0.04	0.15	2.08
Urea (mg/dl)	45.30	57.68	93	5.98	12	572
Creatinina (mg/dl)	1.15	0.68	93	0.07	0.42	6.3
Glucosa (mg/dl)	101.82	10.25	93	1.06	76	136

Los resultados obtenidos han sido clasificados en 3 grupos en función de si se encontraban por encima, por debajo o dentro del rango fisiológico establecido para cada parámetro, considerando como valores de referencia los descritos por Bush y por el

sistema Reflotrón® (Reflotrón®, 1990; Bush, 1991). De este modo, han sido calculadas las frecuencias absolutas y relativas que aparecen en las figuras 21-24.

Fig.21

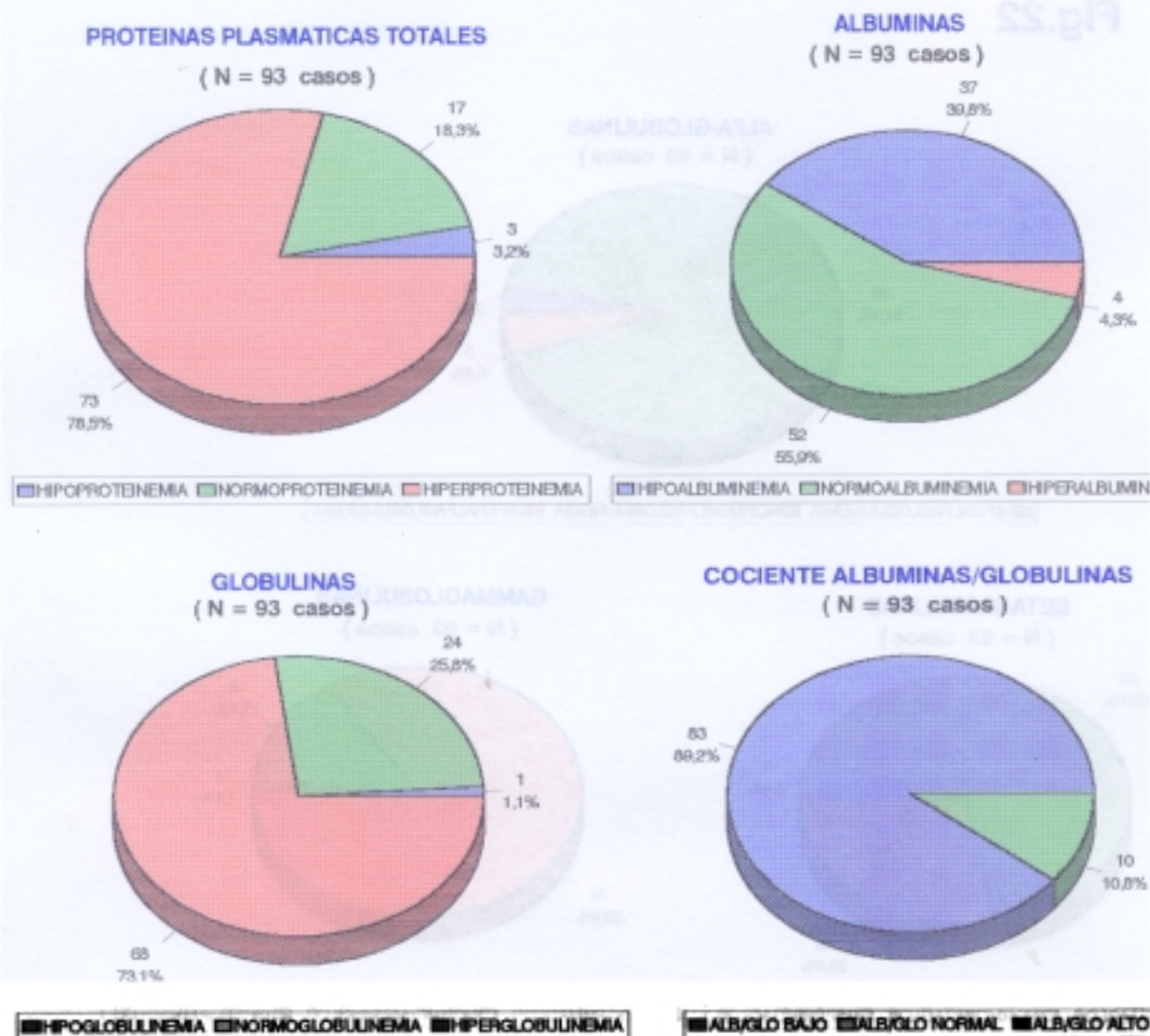


Fig.22

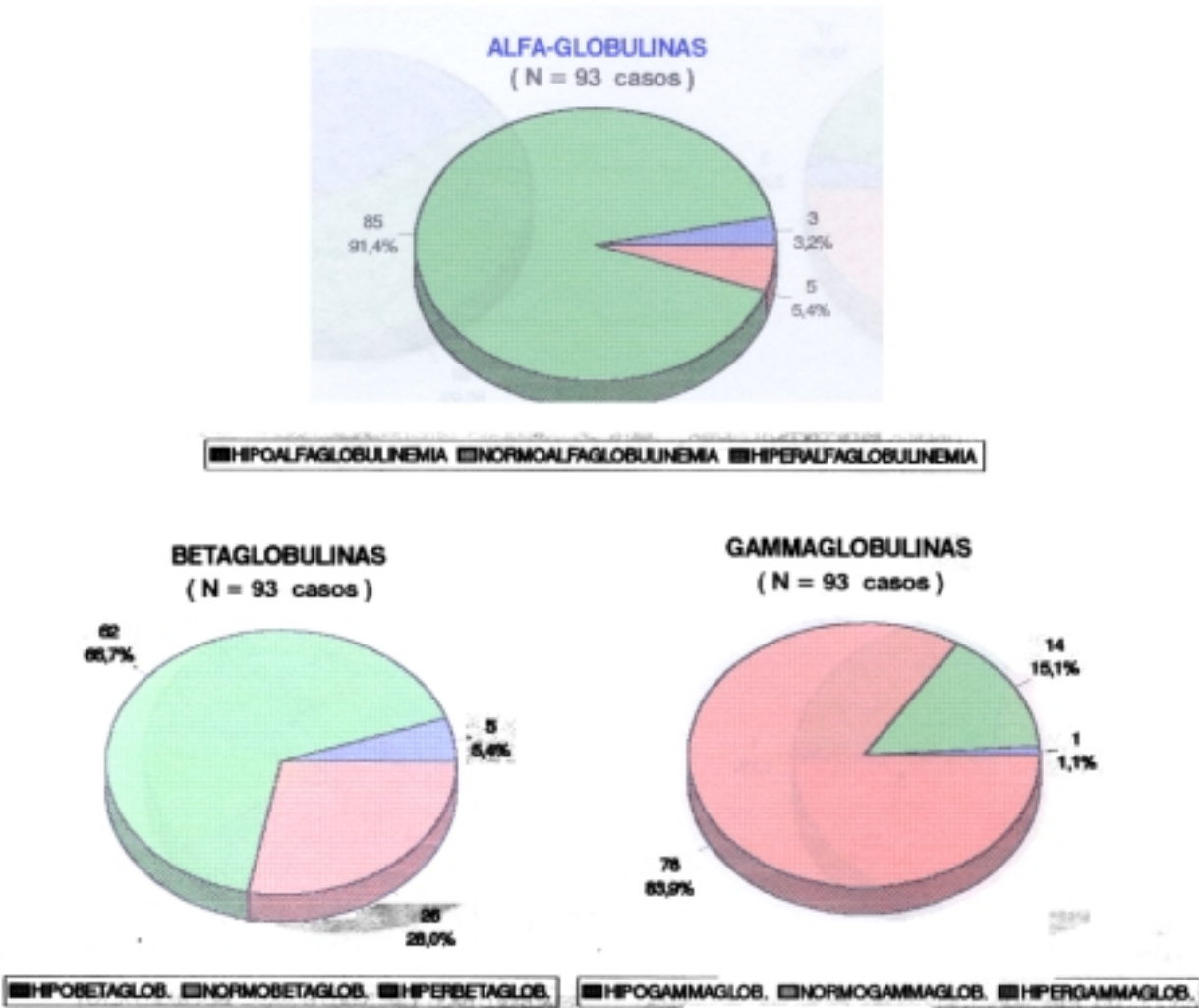
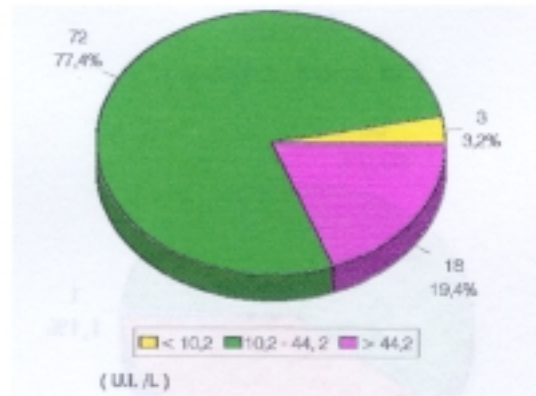
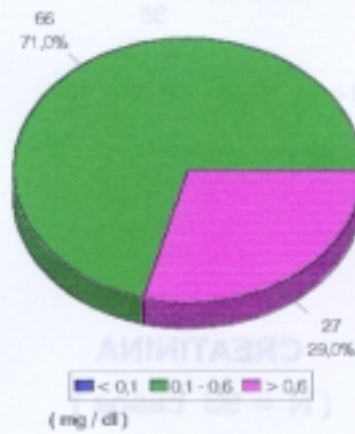


Fig. 23

ALANINO-AMINOTRANSFERASA (GPT)
(N = 93 casos)



BILIRRUBINA
(N = 93 casos)



GLUCOSA
(N = 93 casos)

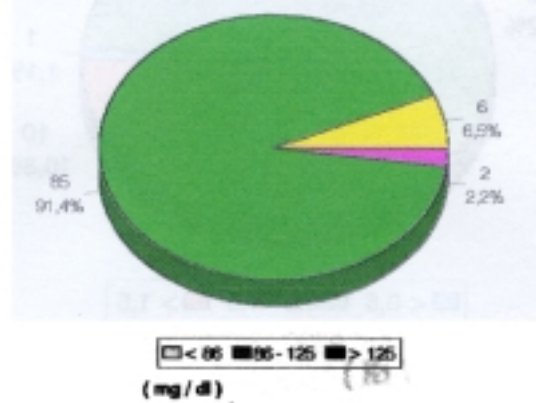
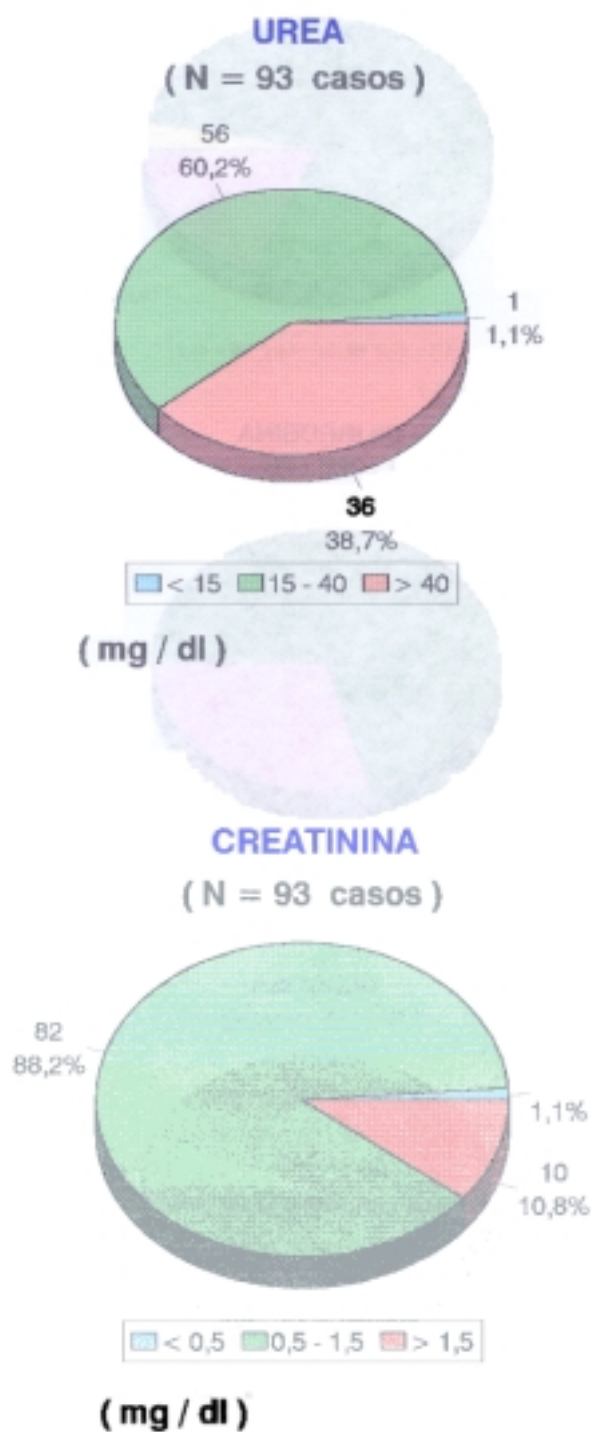


Fig.24

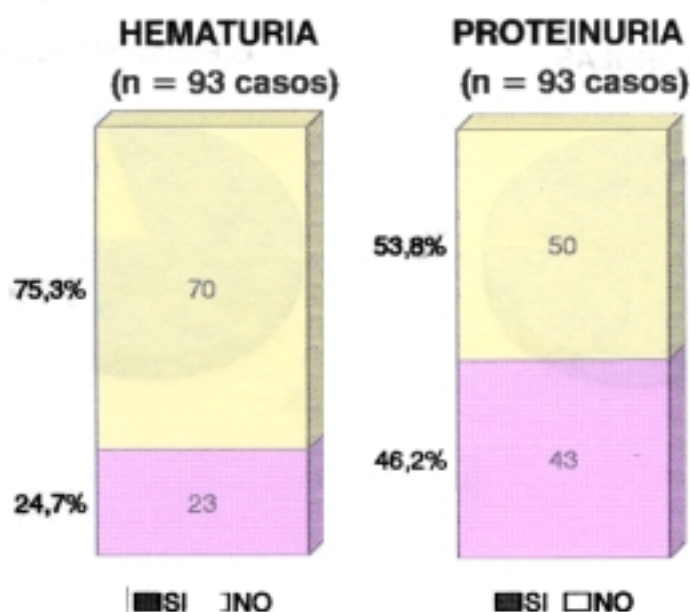


4.3.3. URIANALISIS

Los hallazgos más importantes encontrados en el urianalisis se recogen en las figuras 25 y 26. La observación del sedimento urinario de los perros objeto de estudio arroja los siguientes resultados:

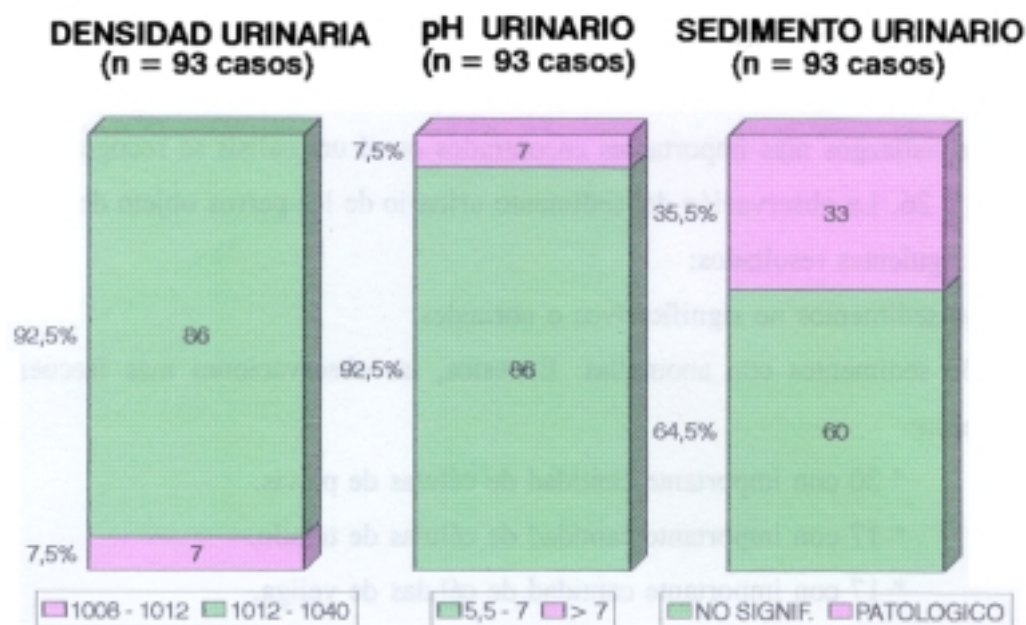
- 60 sedimentos no significativos o normales.
- 33 sedimentos con anomalías. En estos, las observaciones más frecuentes fueron:
 - * 30 con importante cantidad de células de pelvis.
 - * 17 con importante cantidad de células de túbulo.
 - * 17 con importante cantidad de células de vejiga.
 - * 16 con importante cantidad de cilindros granulosos.
 - * 9 con importante cantidad de cristales de estruvita.
 - * 7 con importante cantidad de bacterias.
 - * 7 con importante cantidad de leucocitos.
 - * 1 con importante cantidad de cilindros celulares.

Fig.25



RESULTADOS

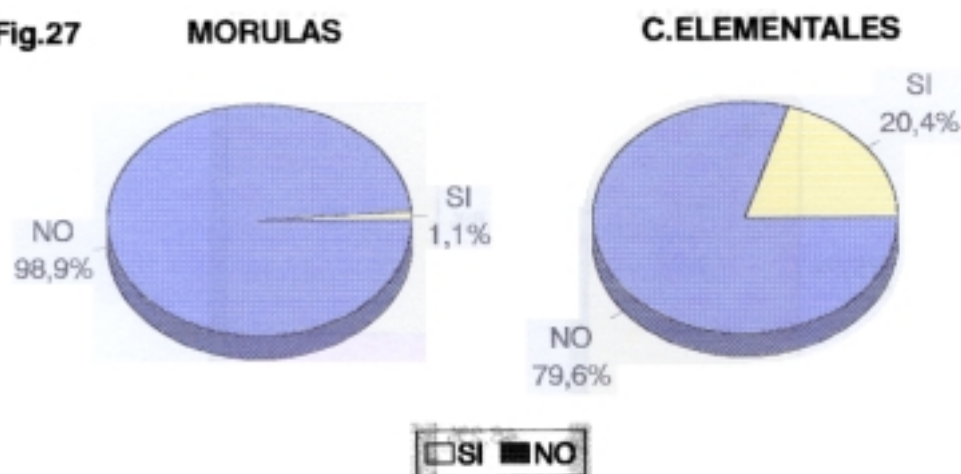
Fig.26



4.3.4. DIAGNOSTICO ETIOLOGICO

Los resultados obtenidos en el estudio microscópico de las muestras de sangre sometidas a leucoconcentración, en cuanto a la observación de mórulas y de cuerpos elementales, aparecen reflejados en la figura 27.

Fig.27



4.3.5. ASOCIACIONES ENTRE DIFERENTES ALTERACIONES BIOPATOLOGICAS

Con el fin de conocer la posible existencia de asociaciones entre las alteraciones biopatológicas detectadas, hemos realizado el estudio de las mismas mediante el test de χ^2 , encontrando las siguientes relaciones estadísticamente significativas:

- hipoalbuminemia y proteinuria ($p < 0.001$).
- hipoalbuminemia y hematuria ($p < 0.05$).
- proteinuria y título de anticuerpos mayores de 1/1280 ($p < 0.05$).
- anemia y título de 1/10240 ($p < 0.001$).
- trombocitopenia y título de 1/10240 ($p < 0.001$).
- trombocitopenia e hiperglobulinemia ($p < 0.05$).
- hiperglobulinemia y título de 1/10240 ($p < 0.001$).
- hipergammaglobulinemia y título de 1/10240 ($p < 0.001$).
- ausencia de cuerpos elementales y título de 1/10240 ($p < 0.01$).

4.4. ENSAYO TERAPEUTICO

4.4.1. RESPUESTA CLINICA

El número de animales que no respondieron al tratamiento fue de 6, lo que supone un 6.45% del total de los casos; no obstante, uno de ellos sí respondió tras cambiar de protocolo. Los resultados obtenidos con cada uno de los grupos establecidos fueron:

- grupo 1-P (doxiciclina): de 32 casos, 2 (6.25%) no respondieron. En estos animales se instauró posteriormente un protocolo 2-P. Uno de los perros siguió sin

RESULTADOS

mejorar, mientras que otro sí lo hizo.

- grupo 2-P (imidocarb): de 31 individuos, 2 (6.45 %) no mejoraron. En ambos casos, se cambió al protocolo 1-P, sin observar ninguna variación en la respuesta.

- grupo 3-P (doxiciclina+imidocarb): de 30 perros, 2 (6.67%) no tuvieron una evolución favorable. Se instauró en ambos casos un nuevo protocolo 3-P sin detectar mejoría alguna.

Incluyendo únicamente aquellos casos con respuesta clínica favorable, el periodo de tiempo transcurrido desde la instauración del tratamiento hasta la presentación de una mejoría clínica evidente se muestra en la siguiente tabla:

Respuesta clínica (días)	Doxiciclina (n=30)	Imidocarb (n=29)	Doxiciclina+Imidocarb (n=28)
1	5(16.66%)	8(27.59%)	6(21.43%)
2	11(36.66%)	6(20.69%)	13(46.43%)
3	6(20%)	3(10.35%)	4(14.29%)
4	2(6.67%)	5(17.24%)	1(3.57%)
5	2(6.67%)	3(10.35%)	1(3.57%)
6	2(6.67%)	2(6.89%)	1(3.57%)
7 ó más	2(6.67%)	2(6.89%)	2(7.14%)
Media	3.16	3.21	3.14

4.4.2. EVOLUCION BIOPATOLOGICA POST-TRATAMIENTO

En este apartado hemos incluido aquellos parámetros biopatológicos considerados como más relevantes en cuanto a la evolución post-tratamiento.

En primer lugar, hemos realizado un estudio estadístico mediante análisis de varianza de los distintos datos analíticos de los tres grupos terapéuticos, para conocer si alguno de estos grupos presentaba, ya antes de comenzar el protocolo, diferencias significativas con el resto, descartándose este extremo en todos los casos, excepto para los valores medios del recuento eritrocitario y de albúmina. En contraste, los perros controles sí presentaban diferencias importantes en la mayoría de los parámetros biopatológicos con respecto a la población enferma.

El reducido número de perros control no nos ha permitido realizar comparaciones estadísticas entre éstos y los perros enfermos de cada uno de los grupos. Todos los animales control presentaron un estado clínico y unos valores analíticos completamente normales a lo largo de toda la experiencia. Estos perros nos han servido, fundamentalmente, para descartar la existencia de alteraciones biopatológicas provocadas por los distintos tratamientos empleados.

En líneas generales, el análisis de varianza no muestra diferencias significativas entre los tres protocolos terapéuticos, en cuanto a la respuesta final. Sin embargo, detallaremos a continuación los resultados obtenidos ya que existen algunas diferencias en cuanto a la evolución en el tiempo de algunos de estos parámetros.

Título de anticuerpos

Los resultados mostrados en las tablas que aparecen a continuación se corresponden con el valor inverso del título obtenido.

RESULTADOS

A) Grupo 1-P (doxiciclina).

Periodo	Media	Desv. Típica	Error estandard
Inicial	6,815	3,742	661
Final Trat.	5,648	3,846	573
2º Trimestre	4,844	4,127	946
4º Trimestre	4,510	4,164	908
8º Trimestre	1,622	1,842	348

B) Grupo 2-P (imidocarb).

Periodo	Media	Desv. Típica	Error estandard
Inicial	5,801	3,616	649
Final Trat.	6,115	3,373	1,124
2º Trimestre	6,431	3,640	1,213
4º Trimestre	4,808	3,533	790
8º Trimestre	1,897	1,624	434

C) Grupo 3-P (protocolo mixto)

Periodo	Media	Desv. Típica	Error estandard
Inicial	7,618	3,662	668
Final Trat.	5,036	3,833	591
2º Trimestre	5,690	4,306	1,044
4º Trimestre	4,825	2,739	684
8º Trimestre	2,555	2,001	667

En los tres protocolos, la evolución de los títulos medios presentó un descenso estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Sin embargo, estas tres distribuciones al ser comparadas entre sí se comportan de un modo homogéneo.

Con respecto al título inicial, no se observaron diferencias significativas hasta el 8º trimestre ($p < 0.01$) en los tres casos.

Proteinograma

De todos los valores obtenidos en el proteinograma, consideramos relevantes para su estudio los niveles de albúmina, gamma-globulinas y el cociente albúmina/globulinas.

Albúmina (g/dl)

A) Grupo 1-P (doxiciclina).

Periodo	Media	Desv. Típica	Error estandard
Inicial	2.45	0.64	0.11
Final Trat.	2.73	0.62	0.09
2º Trimestre	3.05	0.50	0.11
4º Trimestre	3.16	0.45	0.10
8º Trimestre	3.23	0.48	0.09

RESULTADOS

B) Grupo 2-P (imidocarb).

Periodo	Media	Desv. Típica	Error estandard
Inicial	2.97	0.73	0.13
Final Trat.	2.90	0.64	0.21
2º Trimestre	3.01	0.42	0.14
4º Trimestre	3.02	0.52	0.11
8º Trimestre	3.05	0.58	0.16

C) Grupo 3-P (protocolo mixto).

Periodo	Media	Desv. Típica	Error estandard
Inicial	2.53	0.65	0.12
1 Mes	2.90	0.62	0.10
2º Trimestre	3.13	0.45	0.11
4º Trimestre	3.22	0.38	0.09
8º Trimestre	3.53	0.29	0.10

La evolución de los valores medios de albúmina presenta un lento y progresivo aumento, estadísticamente significativo para los grupos 1-P y 3-P ($p < 0.01$). En ambos casos, con respecto al valor inicial de albumina se detecta esta diferencia a partir del 2º trimestre ($p < 0.01$).

Gamma-globulinas (g/dl)

A) Grupo 1-P (doxiciclina).

Periodo	Media	Desv. Típica	Error estandard
Inicial	3.71	1.95	0.34
Final Trat.	2.74	1.52	0.23
2º Trimestre	1.93	1	0.23
4º Trimestre	1.55	0.64	0.14
8º Trimestre	1.33	0.48	0.09

B) Grupo 2-P (imidocarb).

Periodo	Media	Desv. Típica	Error estandard
Inicial	3.08	1	0.18
Final Trat.	3.02	1.16	0.39
2º Trimestre	3.05	0.99	0.33
4º Trimestre	2.27	0.77	0.17
8º Trimestre	1.81	0.83	0.22

C) Grupo 3-P (protocolo mixto).

Periodo	Media	Desv. Típica	Error estandard
Inicial	3.55	1.94	0.35
Final Trat.	2.46	1.19	0.18
2º Trimestre	2.09	0.89	0.22
4º Trimestre	1.68	0.83	0.21
8º Trimestre	1.44	0.43	0.14

RESULTADOS

Con los tres protocolos tiene lugar un descenso significativo de los valores medios de gammaglobulinas ($p < 0.01$). Esta disminución es más lenta cuando se emplea dipropionato de imidocarb, con el cual las diferencias respecto al valor inicial no se observan hasta el 8º trimestre ($p < 0.01$); por el contrario, con los otros dos tratamientos, este hecho se produce a partir del 2º trimestre ($p < 0.05$).

Cociente albúmina/globulinas

A) Grupo 1-P (doxiciclina).

Periodo	Media	Desv. Típica	Error estandard
Inicial	0.43	0.21	0.04
Final Trat.	0.56	0.27	0.04
2º Trimestre	0.71	0.30	0.07
4º Trimestre	0.81	0.30	0.06
8º Trimestre	0.89	0.29	0.05

B) Grupo 2-P (imidocarb).

Periodo	Media	Desv. Típica	Error estandard
Inicial	0.51	0.18	0.03
Final Trat.	0.53	0.24	0.08
2º Trimestre	0.52	0.18	0.06
4º Trimestre	0.66	0.23	0.05
8º Trimestre	0.73	0.23	0.06

C) Grupo 3-P (protocolo mixto).

Periodo	Media	Desv. Típica	Error estandard
Inicial	0.43	0.21	0.04
Final Trat.	0.61	0.28	0.04
2º Trimestre	0.70	0.21	0.05
4º Trimestre	0.76	0.20	0.05
8º Trimestre	0.91	0.15	0.05

Los valores del cociente Alb/Glo se normalizan, siguiendo una evolución muy parecida a la de las gamma-globulinas, observándose similares resultados estadísticos.

Recuento plaquetario (/mm³)

A) Grupo 1-P (doxiciclina).

Periodo	Media	Desv. Típica	Error estandard
Inicial	121,843	115,341	20,389
Final Trat.	183,000	104,655	15,601
2º Trimestre	209,421	95,389	21,883
4º Trimestre	208,666	61,870	13,501
8º Trimestre	192,785	48,975	9,255

RESULTADOS

B) Grupo 2-P (imidocarb).

Periodo	Media	Desv. Típica	Error estandard
Inicial	79,161	58,803	10,561
Final Trat.	106,222	51,499	17,166
2º Trimestre	131,333	85,532	28,510
4º Trimestre	177,400	68,393	15,293
8º Trimestre	189,571	79,100	21,140

C) Grupo 3-P (protocolo mixto).

Periodo	Media	Desv. Típica	Error estandard
Inicial	83,200	46,597	8,507
Final Trat.	152,714	75,405	11,635
2º Trimestre	184,058	46,574	11,295
4º Trimestre	178,187	42,806	10,701
8º Trimestre	199,222	33,770	11,256

Los valores medios de los recuentos plaquetarios aumentan significativamente tras la instauración de cualquiera de los protocolos empleados ($p < 0.01$). Al comparar estas tres distribuciones, sólo se observan diferencias entre ellas al final del tratamiento ($p < 0.05$).

Los aumentos son significativos respecto a los valores iniciales, a partir del segundo trimestre para los grupos 1-P y 3-P, mientras que se retrasa hasta el 4º trimestre en el grupo 2-P.

Recuento de hematíes (/mm³)**A) Grupo 1-P (doxiciclina).**

Periodo	Media	Desv. Típica	Error estandard
Inicial	5,202,031	1,594,613	281,890
Final Trat.	6,004,667	1,978,361	294,916
2º Trimestre	6,239,479	2,347,353	538,519
4º Trimestre	7,009,047	1,041,522	227,278
8º Trimestre	7,353,571	984,675	186,086

B) Grupo 2-P (imidocarb)

Periodo	Media	Desv. Típica	Error estandard
Inicial	6,774,193	1,990,225	357,455
Final Trat.	6,297,777	1,652,012	550,670
2º Trimestre	7,438,888	868,611	289,537
4º Trimestre	7,074,500	973,168	217,607
8º Trimestre	7,036,428	847,953	226,625

C) Grupo 3-P (protocolo mixto).

Periodo	Media	Desv. Típica	Error estandard
Inicial	4,746,766	1,634,853	298,482
Final Trat.	5,570,738	1,950,305	300,938
2º Trimestre	5,917,117	1,524,377	369,715
4º Trimestre	6,794,375	833,330	208,332
8º Trimestre	6,911,111	611,032	203,677

RESULTADOS

El recuento eritrocitario en el grupo 2-P presenta unos valores medios normales incluso antes de la instauración del tratamiento, por lo que es lógico que no se encuentren variaciones en su evolución. Sin embargo, en el caso de los grupos 1-P y 3-P, con valores iniciales inferiores a lo normal, se observa un significativo aumento de este recuento ($p < 0.01$) con el paso del tiempo.

Tanto en el grupo 1-P como en el 3-P, las diferencias con respecto a los resultados iniciales se producen a partir del 4º trimestre ($p < 0.01$).

Urianálisis

Entre los resultados del urianálisis describiremos los relacionados con la hematuria y proteinuria.

No hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a la evolución de estas dos alteraciones entre los tres protocolos de tratamiento, lo que nos permite analizarlas conjuntamente. La distribución de las frecuencias absolutas se muestran en la siguiente:

Periodo	Hematuria	Proteinuria
Inicial	23	43
Final Tra.	15	33
2º Trimestre	4	17
4º Trimestre	4	16
8º Trimestre	3	9

Detección de cuerpos de inclusión de *E.canis*

La frecuencia absoluta de casos en los que se detectaron mórulas o cuerpos elementales, tras la instauración de los diferentes tratamientos, aparece reflejada en la siguiente tabla:

Periodo	Doxiciclina	Imidocarb	Protocolo mixto
Inicial	4	9	6
Final Tra.	0	1	2
2º Trimestre	0	1	0
4º Trimestre	0	0	0
8º Trimestre	0	0	0

4.5. ESTUDIO EPIZOOTIOLOGICO

4.5.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO

A) Estudio descriptivo de los sueros recibidos en el Servicio de Diagnóstico de ehrlichiosis desde enero de 1993 hasta diciembre de 1995

De los 2523 sueros remitidos en estos 3 años, 555 fueron positivos lo que significa una seroprevalencia, en esta población sospechosa, del $21.99 \pm 0.82\%$. La

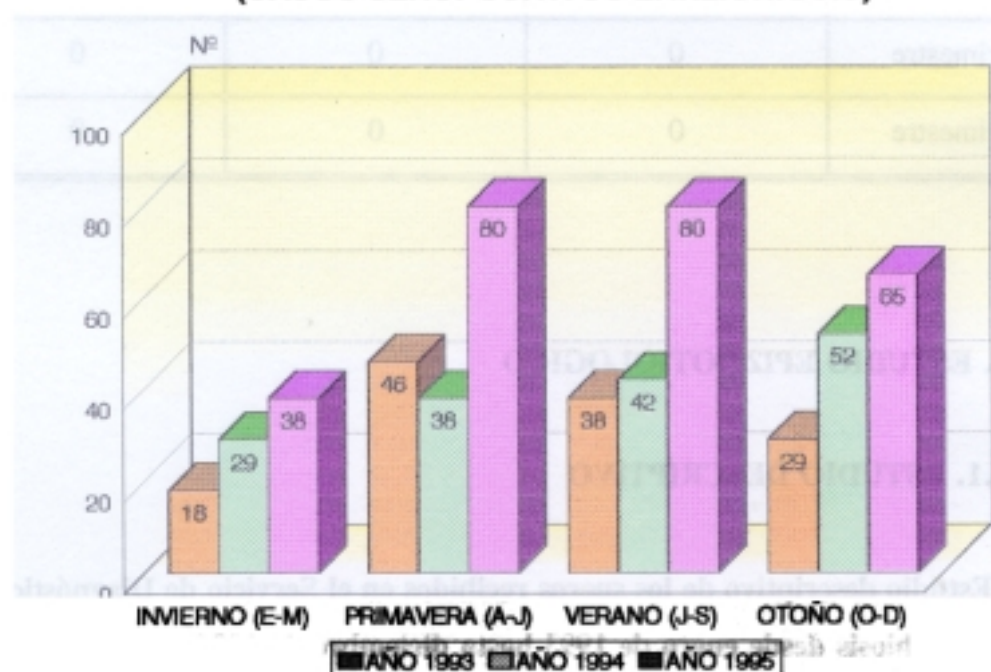
RESULTADOS

distribución anual de sueros controlados y positivos fue la siguiente:

AÑO	Muestras controladas	Muestras positivas	Seroprevalencia (%) \pm Sp
1993	451	131	29.05 \pm 2.14
1994	739	161	21.79 \pm 1.52
1995	1333	263	19.73 \pm 1.09

Comparando estos resultados, empleando el test de la χ^2 , las diferencias entre el primer año y los dos posteriores son estadísticamente significativas ($p < 0.001$).

**Fig.28. DISTRIBUCION ESTACIONAL
(CASOS SEROPOSITIVOS EHRLICHIOSIS)**



La distribución estacional del número de casos seropositivos no presentaba diferencias significativas en función del año estudiado (Fig.28). Este hecho nos ha

permitido agrupar los resultados trimestralmente, con independencia del año, obteniendo las siguientes seroprevalencias:

Periodo	Muestras controladas	Muestras positivas	Seroprevalencia (%) \pm Sp
Enero-Marzo	518	85	16.41 \pm 1.63
Abril-Junio	783	164	20.94 \pm 1.45
Julio-Septiembre	556	160	28.78 \pm 1.92
Octubre-Diciembre	666	146	21.92 \pm 1.60

El estudio estadístico mediante el test de la χ^2 mostró la existencia de diferencias significativas, por un lado, entre el periodo enero-marzo y el resto del año ($p < 0.001$) y, por otro, entre julio-septiembre y el resto del año ($p < 0.01$).

También, en este apartado, queremos hacer mención de la recepción de muestras procedentes de fuera de la Comunidad Autónoma de Madrid, lo que ha dado lugar a la descripción de casos de ehrlichiosis canina en diferentes zonas del territorio nacional (Fig.29). Hemos recibido, en este periodo de tiempo, un total de 206 sueros sospechosos de los que 43 (20.87 \pm 2.83 %) han sido positivos. En concreto, durante estos 3 años hemos confirmado serológicamente el diagnóstico de ehrlichiosis canina en las siguientes provincias españolas:

- Alicante: 6 casos.
- Cáceres: 1 caso.
- Cádiz: 5 casos.

**Fig.29. DISTRIBUCION GEOGRAFICA CASOS SEROPOSITIVOS
(EHRlichiosis CANINA) AÑOS 1993-95**



- Ciudad Real: 2 casos.
- Cuenca: 1 caso.
- Gerona: 2 casos.
- Guadalajara: 1 caso.
- Huelva: 4 casos.
- Pontevedra: 5 casos.
- Salamanca: 1 caso.
- Segovia: 2 casos.
- Sevilla: 3 casos.
- Toledo: 5 casos.
- Valencia: 1 caso.
- Valladolid: 2 casos.
- Vizcaya: 1 caso.
- Zaragoza: 1 caso.

B) Estudio de diferentes características implicadas en la epizootiología de la ehrlichiosis en perros diagnosticados de esta enfermedad

En las figuras 30-42 se recogen las distribuciones de los diferentes factores considerados en los 171 perros con ehrlichiosis incluidos en este apartado.

Fig.30. DISTRIBUCION SEGUN EDAD
(n = 171 casos)

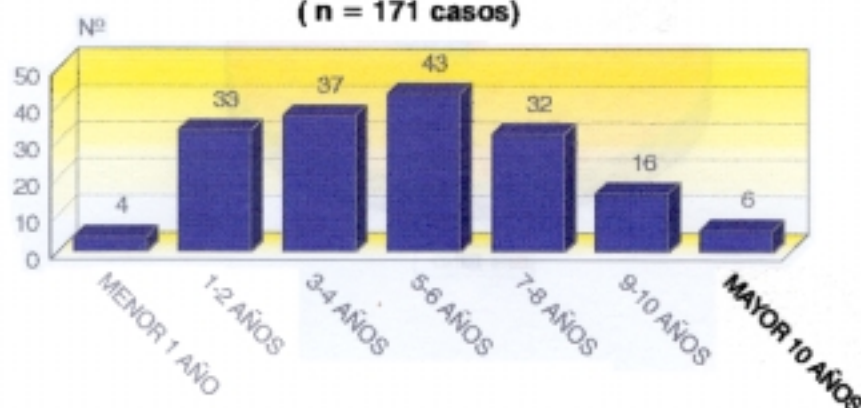


Fig.31 DISTRIBUCION SEGUN RAZAS

(n = 171 casos)

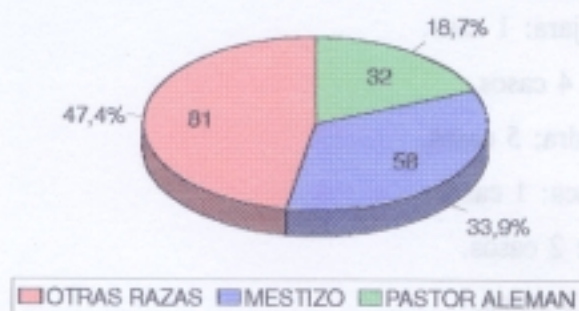


Fig.32. DISTRIBUCION SEGUN SEXO

(n = 171 casos)

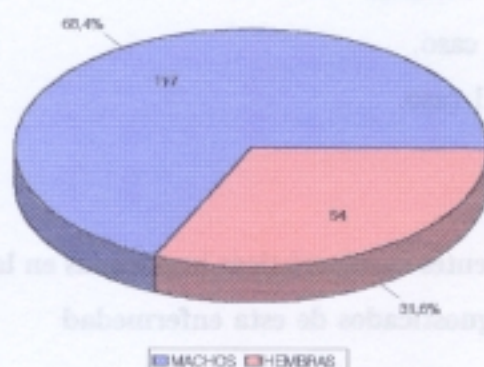


Fig.33. DISTRIBUCION SEGUN ANTECEDENTES GARRAPATAS

(n = 171 casos)

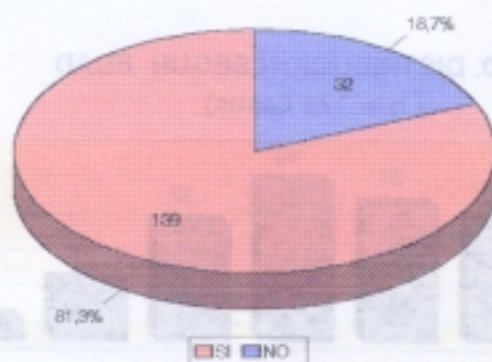


Fig.34. DISTRIBUCION SEGUN CONVIVENCIA CON OTROS PERROS
(n = 171 casos)

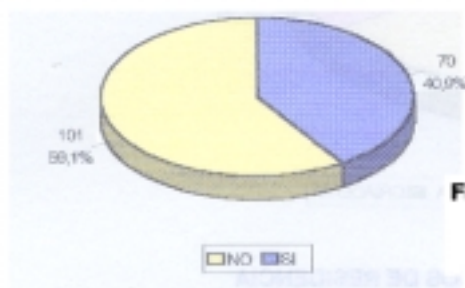


Fig.35. DISTRIBUCION SEGUN CONVIVENCIA CON PERROS CON SINTOMAS DE EHRLICHIOSIS
(n = 171 casos)

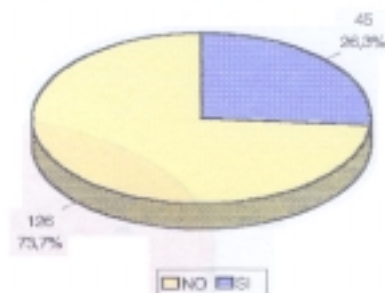


Fig.36. DISTRIBUCION SEGUN CONVIVENCIA CON PERROS CON EHRLICHIOSIS
(n = 171 casos)

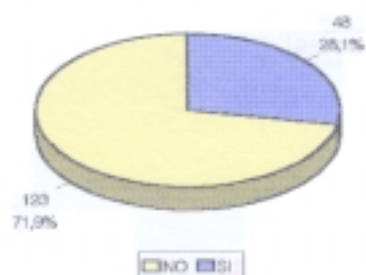


Fig.37. DISTRIBUCION SEGUN TIPO DE VIVIENDA

(n = 171 casos)

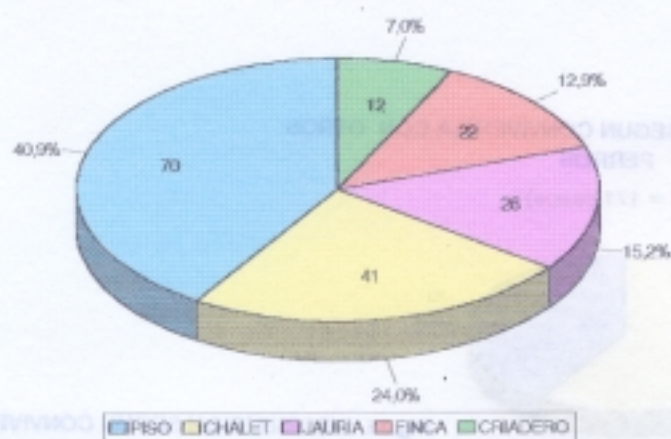


Fig.38. DISTRIBUCION SEGUN CAMBIOS DE RESIDENCIA

(n = 171 casos)

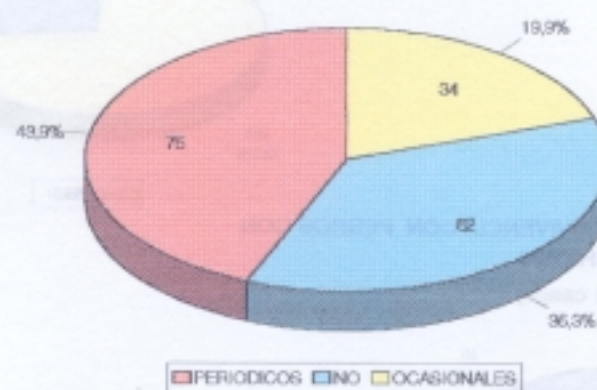
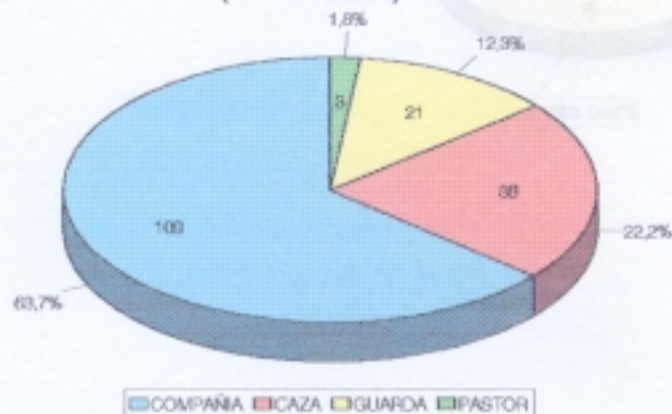
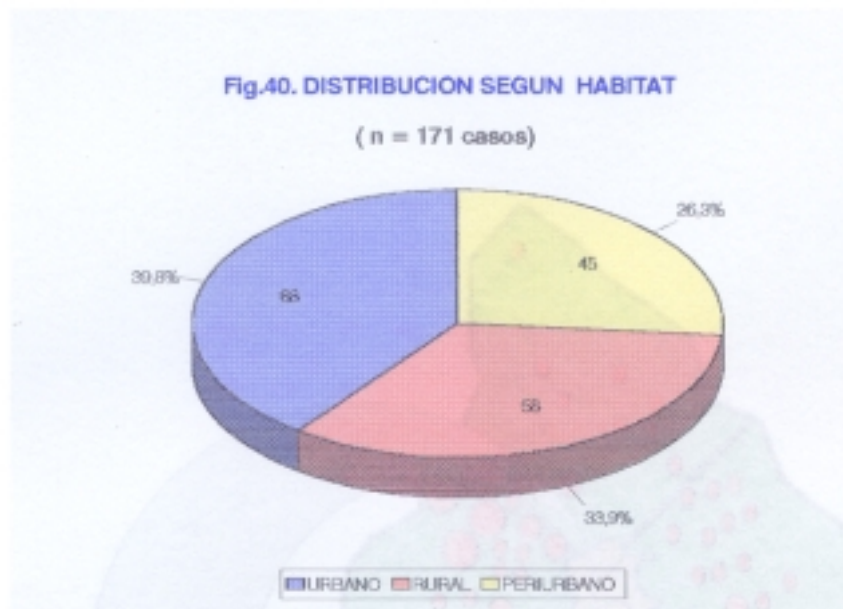


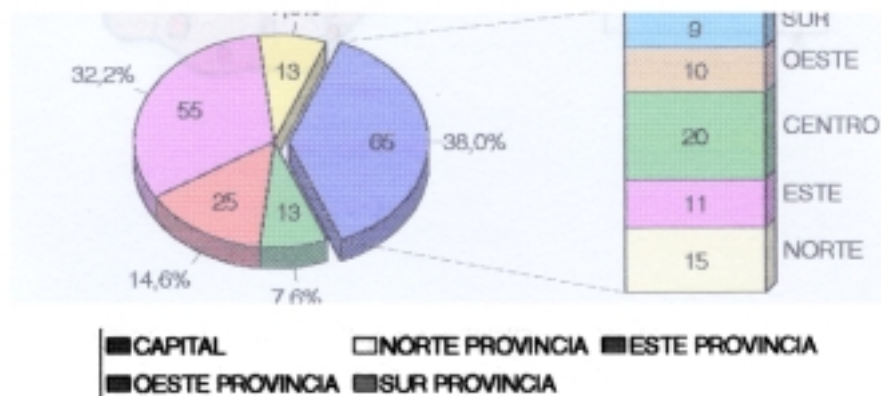
Fig.39. DISTRIBUCION SEGUN APTITUD

(n = 171 casos)



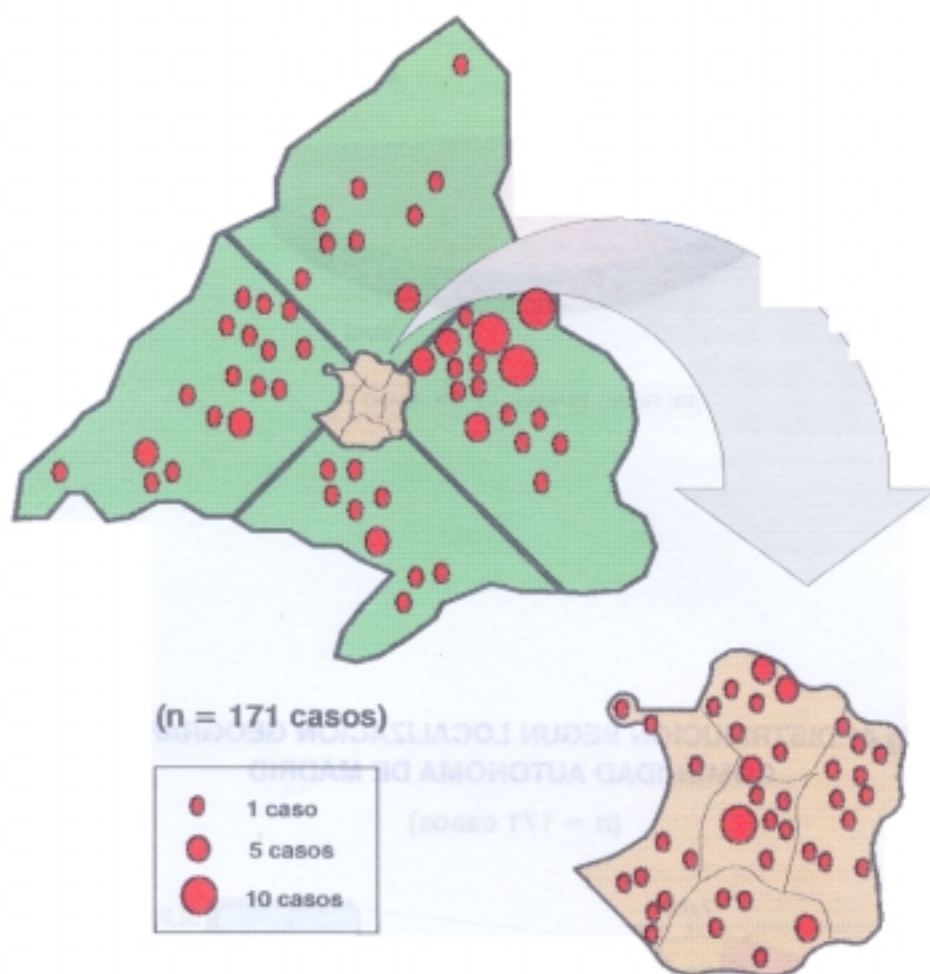


**Fig.41.DISTRIBUCION SEGUN LOCALIZACION GEOGRAFICA
COMUNIDAD AUTONOMA DE MADRID**
(n = 171 casos)



RESULTADOS

**Fig.42. LOCALIZACION GEOGRAFICA CASOS EHRlichiosis CANINA
(COMUNIDAD AUTONOMA MADRID)**



4.5.2. ESTUDIO ANALITICO

De los 200 sueros analizados, 13 resultaron positivos mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, lo que supone una seroprevalencia del $6.50 \pm 1.70\%$.

Al analizar los diferentes factores de riesgo para la presencia de infección por *E.canis*, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- *edad*: no se detectaron diferencias significativas.

Edad	Positivos	Negativos	Total
Hasta 1 año	0	26	26
1-2 años	2	19	21
3-4 años	3	26	29
5-6 años	3	21	24
7-8 años	2	31	33
9-10 años	0	20	20
Mayor de 10 años	3	44	47
Total	13	187	200

- *sexo*: no se detectaron diferencias significativas.

Sexo	Positivos	Negativos	Total
Machos	9	92	101
Hembras	4	95	99
Total	13	187	200

RESULTADOS

- *raza*: no se detectaron diferencias significativas.

Raza	Positivos	Negativos	Total
Pastor Alemán	3	41	44
Mestizo	3	42	45
Otras razas	7	104	111
Total	13	187	200

- *presencia de garrapatas*: relación estadísticamente significativa entre la infestación por garrapatas y la existencia de seropositividad ($p < 0.05$).

Presencia de garrapatas	Positivos	Negativos	Total
Sí	11	91	102
No	2	96	98
Total	13	187	200

- *convivencia con otros perros*: no se detectaron diferencias significativas.

Convivencia con otros perros	Positivos	Negativos	Total
Sí	1	31	32
No	12	156	168
Total	13	187	200

- *convivencia con perros con síntomas de ehrlichiosis*: no se detectaron diferencias significativas.

Convivencia con perros con síntomas	Positivos	Negativos	Total
Sí	0	6	6
No	13	181	194
Total	13	187	200

- *convivencia con otros perros diagnosticados de ehrlichiosis*: no se detectaron diferencias significativas.

Convivencia con perros con ehrlichiosis	Positivos	Negativos	Total
Sí	0	13	13
No	2	185	187
Total	2	198	200

- *tipo de vivienda* (piso, chalet, finca, criadero o jauría): no se detectaron diferencias significativas.

Tipo de vivienda	Positivos	Negativos	Total
Piso	11	138	149
Chalet	1	37	38
Finca	1	10	11
Criadero	0	2	2
Jauría	0	0	0
Total	13	187	200

RESULTADOS

- *cambios de residencia* (ausencia, ocasionales o periódicos): no se detectaron diferencias significativas.

Cambios de residencia	Positivos	Negativos	Total
Sí	3	43	46
Ocasionales	4	89	93
Periódicos	6	55	61
Total	13	187	200

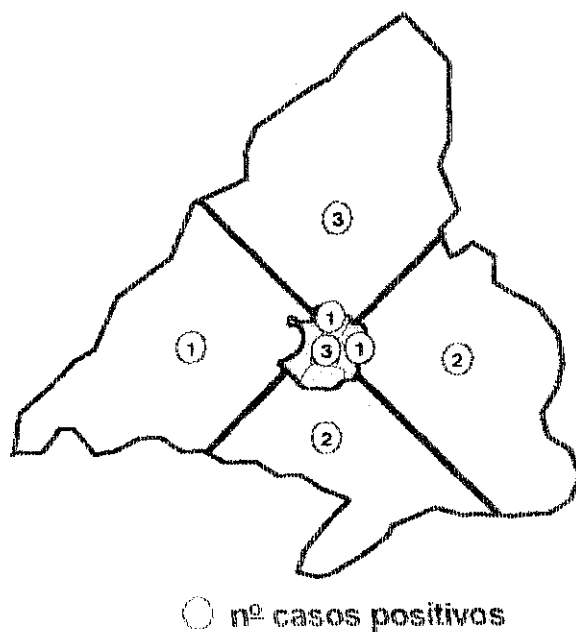
- *aptitud del animal* (compañía, caza, guarda o pastor): no se detectaron diferencias significativas.

Aptitud	Positivos	Negativos	Total
Compañía	10	151	161
Guarda	1	20	21
Caza	2	16	18
Pastor	0	0	0
Total	13	187	200

- *hábitat* (urbano, periurbano y rural): relación estadísticamente significativa entre el hábitat periurbano y la presencia de seropositividad ($p < 0.05$).

Hábitat	Positivos	Negativos	Total
Urbano	5	141	146
Periurbano	7	30	37
Rural	1	16	17
Total	13	187	200

- *zona de residencia dentro de la Comunidad de Madrid* (norte, sur, este, oeste y centro de la capital, norte, sur, este y oeste de la Comunidad Autónoma): no se detectaron diferencias significativas.



Zona	Positivos	Negativos	Total
Norte (capital)	1	18	19
Sur (capital)	0	5	5
Este (capital)	1	14	15
Oeste (capital)	0	11	11
Centro (capital)	3	67	70
Norte (C.A.M.)	3	38	41
Sur (C.A.M.)	2	11	13
Este (C.A.M.)	2	12	14
Oeste (C.A.M.)	1	11	12
Total	13	187	200

RESULTADOS

En cuanto al estudio de seroprevalencia de 2 zonas concretas de la Comunidad Autónoma de Madrid, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Aranjuez: de los 93 sueros analizados, 6 fueron positivos lo que supone una prevalencia del $6.45 \pm 2.55 \%$.

- Navalcarnero: de 76 muestras, 3 resultaron positivas, por lo que la seroprevalencia encontrada en dicha zona fue del $3.95 \pm 2.23 \%$.

Estas tasas no presentaban diferencias significativas con la obtenida para toda la Comunidad de Madrid.

5. Discusión

5.1. ESTUDIO CLINICO

5.1.1. CONCURRENCIA DE EHRLICHIOSIS CON OTROS PROCESOS PATOLOGICOS

La presentación de concurrencias de ehrlichiosis con otros procesos ha sido descrita con cierta frecuencia asociándose a las posibles alteraciones que, en la respuesta inmunitaria, se desarrollan en el curso de este proceso (Greene, 1995).

En la bibliografía se suele encontrar asociada, fundamentalmente, a la babesiosis canina (Donatien y Lestoquard, 1937; Bool y Suttmöller, 1957; Ewing y Buckner, 1965a; Klag et al, 1991; Matthewman et al, 1993). Pese a ello, en nuestro caso tan sólo hemos detectado 4 casos de babesiosis y ehrlichiosis. Este hecho podría venir motivado por la relativamente baja prevalencia de babesiosis encontrada en perros de la provincia de Madrid (Meana et al, 1993). Tanto en el caso de este proceso como en el de hepatozoonosis y hemobartonelosis, la existencia de concurrencias se explica fácilmente por la coincidencia de sus vectores.

En nuestro estudio la presentación conjunta de ehrlichiosis y leishmaniosis canina ha sido observada mucho más a menudo, probablemente debido a la mayor prevalencia de leishmaniosis en nuestra área geográfica (Amela et al, 1995). Por otro lado, la existencia de alteraciones a nivel inmunitario en la leishmaniosis (Abranches et al, 1991) también podría favorecer la instauración de otros procesos, entre los cuales podría estar la ehrlichiosis. Entre los casos detectados por nosotros, se encuentran perros sometidos a una terapia específica frente a la leishmaniosis, en los que la

evolución post-tratamiento no es todo lo buena que cabría esperar. Así, en estos animales el proteinograma no termina de normalizarse debido a que la hiperglobulinemia también estaría producida por la ehrlichiosis. Una vez diagnosticados de ehrlichiosis y tratados frente a ella, su evolución suele ser similar a la de aquellos animales que no presentan concurrencia de estos dos procesos.

En cuanto a los casos de ehrlichiosis y hepatozoonosis, este último proceso se diagnosticó etiológicamente en extensiones sanguíneas, si bien la ausencia de sintomatología locomotora, característica de la enfermedad (Barton et al, 1985), no nos hizo sospechar clínicamente de la presencia del mismo.

La concurrencia de ehrlichiosis y moquillo ha sido encontrada de un modo esporádico; en los 3 casos descritos, se trataba de perros con moquillo que tenían antecedentes de picadura por garrapatas y que presentaban algún síntoma compatible con ehrlichiosis. Sin embargo, debido a su baja frecuencia de presentación, sería necesario el estudio en el futuro de nuevos casos con el fin de conocer mejor los mecanismos patogénicos de esta concurrencia.

5.1.2. CUADRO CLINICO DE LA EHRlichiosis CANINA

Como ya ha sido señalado en la revisión bibliográfica, clásicamente se distinguen tres fases en la patocronia de la ehrlichiosis canina: aguda, subclínica y crónica. Para cada una de estas fases se describe un cuadro clínico con predominio de una sintomatología concreta (Huxsoll et al, 1972; Troy y Forrester, 1990; Woody y Hoskins, 1991). Sin embargo, la presentación de un elevado y variable número de síntomas y alteraciones biopatológicas dificulta muchas veces la diferenciación de estas fases. Además, muchos de los síntomas descritos para este proceso, tales como adelgazamiento, fiebre, anorexia, apatía, procesos respiratorios y hemorrágicos pueden

aparecer tanto en la fase aguda como en la crónica (Troy et al, 1980; Hribernik et al, 1986; Gilbert et al, 1992).

La fase subclínica es, teóricamente, la más sencilla de clasificar debido a la ausencia de síntomas que la caracteriza (Woody y Hoskins, 1991). En nuestro estudio, el 8,18% de los perros con ehrlichiosis no presentaban sintomatología alguna, por lo que, posiblemente, podrían ser incluidos en esta fase. A pesar de ello, algunos animales en fase crónica leve o incluso en fase aguda presentan una sintomatología casi inaparente, por lo que puede pasar totalmente desapercibida. De todos modos, hemos encontrado perros adultos teóricamente asintomáticos que, tras ser sometidos a tratamiento, recobraron una vitalidad que previamente habían perdido y que no había sido detectada por los dueños del animal. Estos casos tienen una gran importancia desde un punto de vista epizootiológico ya que pueden comportarse como reservorios de la enfermedad.

La virulencia de la cepa de *E.canis*, la duración del proceso, el grado de respuesta del perro afectado, su edad y raza son factores que determinan la evolución de la enfermedad con la presentación de un mayor o menor número de manifestaciones clínicas (Nyindo et al, 1980; Greene y Harvey, 1984).

Todos estos factores, unidos al desconocimiento en un gran número de casos del tiempo transcurrido desde el momento de la infección, hacen que pocas veces dispongamos de los elementos necesarios para situar a cada enfermo en una de estas fases de la infección.

Por este motivo, y de acuerdo con distintos autores (Kuehn y Gaunt, 1985; Woody y Hoskins, 1991), los resultados obtenidos en nuestro estudio clínico de la ehrlichiosis canina de presentación natural han sido analizados conjuntamente, sin diferenciar el periodo de la enfermedad en el que se encuentra cada caso.

DISCUSION

Entrando ya a comentar los resultados obtenidos, el número de síntomas identificados en relación con la ehrlichiosis canina supera los 50, lo cual viene a corroborar los hallazgos de diferentes investigadores acerca de los aspectos clínicos de esta enfermedad (Kuehn y Gaunt, 1985; Troy et al, 1980; Waddle y Littman, 1988; Woody y Hoskins, 1991).

Entre los 157 casos con sintomatología, comprobamos como el cuadro clínico predominante es el clasificado como **síntomas generales**, observados en más del 75% de los casos. A continuación nos encontraríamos las manifestaciones respiratorias, oculares y cutáneas con una presentación de entre el 35 y el 40%. Un tercer grupo estaría formado por los síntomas locomotores y digestivos con una frecuencia en torno al 25% y, finalmente, con una presentación aún menor los síntomas urinarios y reproductores.

Sin duda alguna, la predominancia de cuadros inespecíficos es típica de la ehrlichiosis canina (Woody y Hoskins, 1991). De todos los síntomas observados en nuestro estudio, los más habituales han sido la apatía, la adinamia y la pérdida de peso, todos ellos englobados en este grupo, con una presentación superior al 50% de los animales. Dentro de este mismo grupo de síntomas generales, también es muy importante la frecuencia con la que se pueden observar anorexia y fiebre. Estos resultados coinciden con los de otros autores, los cuales señalan todos estos signos clínicos como los más observados en infecciones naturales (Kuehn y Gaunt, 1985; Waddle y Littman, 1988); la explicación a esto puede estar, como ya hemos comentado, en la persistencia de este tipo de síntomas a lo largo tanto de la fase aguda como de la crónica.

Hemos encontrado la existencia de relación estadísticamente significativa entre la presentación de síntomas generales y de síntomas respiratorios y oculares. Este hecho puede deberse al elevado número de casos que presentan al mismo tiempo cuadros

inespecíficos unidos a un exudado oculonasal, en las fases agudas y crónicas.

También se asocia en nuestro estudio la presencia de síntomas generales con la de cuadros urinarios y digestivos; este hallazgo puede explicarse fácilmente ya que, por un lado, entre los síntomas generales se incluyen las hemorragias y, por otro, en los cuadros digestivos y urinarios se engloban la hematuria y la hematoquezia respectivamente.

La frecuencia de presentación de **hemorragias** (35,67%) es similar a la encontrada por otros autores (Kuehn y Gaunt, 1985; Waddle y Littman, 1988), si bien en otra serie de casos clínicos se observa más a menudo (Troy et al, 1980). El hecho de que el recuento plaquetario haya sido empleado, en ocasiones, como un paso previo para la realización de técnicas específicas de diagnóstico de ehrlichiosis puede provocar una sobreestimación de la incidencia de trombocitopenia y, por tanto, de síntomas hemorrágicos en estudios sobre infección natural (Woody y Hoskins, 1991). Así, algunos autores han encontrado frecuencias de hemorragias incluso inferiores a las observadas por nosotros en este trabajo (Price et al, 1987).

Dentro de los signos hemorrágicos suele destacar, por su elevada frecuencia de presentación, la epistaxis (Price et al, 1987; Troy y Forrester, 1990). Sin embargo, las referencias concretas en cuanto a la incidencia de los diferentes síntomas de este tipo son escasas. En nuestro caso 41 de los 61 perros con hemorragias (un 67,21%) presentaban epistaxis. Además, diferentes perros no incluidos en este estudio por presentar también leishmaniosis presentaban episodios periódicos de epistaxis pese a estar tratados, con antimoniales y alopurinol, y controlados de un modo rutinario. Estos hechos deben sugerirnos que la epistaxis es un síntoma a tener en cuenta de cara al diagnóstico de la ehrlichiosis canina en nuestra área geográfica. También nos parece interesante señalar, en algunos perros sin epistaxis, la existencia de una pequeñas úlceras en la parte más externa de la cara lateral de las fosas nasales.

El resto de los síntomas hemorrágicos aparecen con menos frecuencia, destacando entre ellos la presencia de petequias y equimosis, hematuria, hematoquezia y hemorragia subconjuntival. Estos síntomas, a menudo, aparecieron asociados a epistaxis. En contraste con lo detectado por otros autores (Troy et al, 1980), no hemos detectado ningún caso de hematomas producidos tras extracción sanguínea o tras inyección de fármacos.

Los resultados obtenidos muestran que la hepato y esplenomegalia, consecuencia directa de la patogenia de este proceso, se presentan en aproximadamente un 15% de los perros con ehrlichiosis. Aunque la esplenomegalia ha sido descrita incluso hasta en un 37% de los casos, los estudios al respecto se han realizado en una población de 27 animales (Waddle y Littman, 1988). Estas alteraciones no siempre son apreciables, por lo que no es extraño encontrar variaciones en los distintos trabajos publicados (Troy et al, 1980; Kuehn y Gaunt, 1985).

Sin embargo, existen otros datos fácilmente detectables por técnicas exploratorias rutinarias; en este sentido cabe destacar, en la exploración de perros con ehrlichiosis, la presencia de mucosas anémicas y de linfadenomegalia. Aunque se trata de signos claramente inespecíficos, éstos pueden ayudarnos a la elaboración de un diagnóstico de presunción. Los 4 animales con mucosas congestivas presentaban, en el momento de la exploración, un síndrome febril con temperaturas superiores a los 40°C.

En cuanto al **aparato locomotor**, los síntomas más frecuentemente encontrados por nosotros son las cojeras, si bien éstas no solían ser el motivo de consulta y, únicamente, eran reseñadas por los dueños como un dato que recordaban al ser interrogados en la anamnesis. Normalmente se trataba de un síntoma de poca intensidad e intermitente. En los casos en los que se realizó un estudio radiológico complementario no se observó alteración alguna.

La sintomatología articular, en especial los casos de artritis, se ha asociado mucho más frecuentemente con infecciones por *E.ewingii* (Anderson et al, 1992b). El número de casos en los que detectamos artritis fue bajo, no pudiendo observarse, en su líquido sinovial, cuerpos de inclusión de *Ehrlichia* ni en células mononucleares ni en polimorfonucleares. Según nuestros resultados, la presencia de procesos articulares se ha asociado fundamentalmente con cuadros oftalmológicos y cutáneos y con sintomatología relacionada con el aparato urinario; llama poderosamente la atención la asociación de cojeras con síntomas oculares, pese a lo cual no encontramos una explicación lógica al respecto.

Por otro lado, no hemos podido diagnosticar ningún caso de polimiositis asociada a ehrlichiosis canina. Los animales incluidos en el epígrafe de atrofia muscular presentaban, todos ellos, una importante pérdida de peso.

Los procesos neurológicos descritos en la ehrlichiosis son muy variados, pero su presentación suele ser esporádica (Troy et al, 1980; Meinkoth et al, 1989). Nosotros hemos encontrado algunos animales con ataxia, si bien, como ya hemos comentado, se trataba de enfermos con anemias muy marcadas y con un estado de depresión importante. No obstante, la frecuencia de perros con estos síntomas es muy parecida a la de otros estudios clínicos (Troy et al, 1980; Waddle y Littman, 1988). La presencia de convulsiones, en 4 individuos, remitió con tratamiento específico frente a ehrlichiosis; sin embargo, no se realizó en ninguno de ellos un análisis de líquido cefalorraquídeo, recomendado en estos casos.

Diferentes síntomas oftalmológicos han sido descritos en el curso de la ehrlichiosis (Troy et al, 1980; Hoskins et al, 1983). La presencia de un exudado tanto a nivel ocular como nasal puede presentarse en las fases aguda y crónica (Huxsoll et al, 1970b; Codner et al, 1985). La frecuencia encontrada por nosotros, superior al 30%, sugiere que éste podría ser otro de los síntomas a tener en cuenta en el

diagnóstico de este proceso. Muchas veces esta secreción se acompaña de conjuntivitis (Kuehn y Gaunt, 1985). La presentación de uveitis anterior es similar a la encontrada por otros autores (Troy y Forrester, 1990); debido a su frecuente presentación bilateral, la ehrlichiosis canina debe ser incluida en el listado de diagnósticos diferenciales en este tipo de casos.

La presentación simultánea de síntomas oftalmológicos (en concreto, uveitis) y cutáneos podría deberse a la existencia de mecanismos inmunomediados que podrían influir de un modo parecido en la instauración de los dos cuadros; de hecho, ambos se describen, fundamentalmente, en fases crónicas del proceso en los que la respuesta inmunitaria es exacerbada. También las alteraciones oftalmológicas se han asociado, principalmente, a problemas respiratorios, lo cual puede estar motivado, como ya hemos comentado, por la frecuente aparición de un exudado oculonasal. Cabe destacar, en este sentido, que casi todos los animales que presentaban secreción nasal, también tenían esta misma secreción a nivel ocular; sin embargo, la situación contraria no se daba. Esto explica que la frecuencia de presentación del exudado nasal sea ligeramente inferior a la del ocular.

Continuando con los **síntomas respiratorios**, la disnea en algunos animales se debía a la existencia de procesos anémicos graves que motivaban la aparición de taquipnea y fatiga. Por otra parte, los procesos neumónicos intersticiales se han asociado con ehrlichiosis repetidas veces (Huxsoll et al, 1970b; Codner et al, 1985). La neumonía, en ocasiones complicada por infecciones secundarias, justificaría la existencia de cuadros tanto de disnea como de tos. Las frecuencias de presentación de estos procesos son similares a las descritas por otros autores (Kuehn y Gaunt, 1985).

La frecuente presentación conjunta de cuadros respiratorios y digestivos y, por otra parte, de cuadros respiratorios y urinarios, sólo viene a reafirmar el elevado número de casos en los que se presenta un cuadro clínico con síntomas variados.

Los **síntomas digestivos** no suelen ser muy habituales y se han limitado, casi exclusivamente, a la presencia de hematemesis y de sangre en heces en animales con tendencias hemorrágicas (Hildebrant et al, 1973b; Woody y Hoskins, 1991). En nuestra serie clínica, hemos detectado un importante número de perros con diarrea no sanguinolentas. También se han diagnosticado diferentes casos de diarrea de tipo crónico, fundamentalmente de intestino grueso. Desde un punto de vista histológico, en el curso de la ehrlichiosis puede aparecer, en la lámina propia y en la submucosa intestinal, un infiltrado de células plasmáticas y linfocitos similar al detectado en otros órganos (Ewing, 1969; Hildebrant et al, 1973b). Este infiltrado podría jugar un papel importante en la patogenia de los procesos diarreicos encontrados en nuestro estudio.

En un caso en el que tuvimos ocasión de llevar a cabo una colonoscopia con toma de biopsias, detectamos un infiltrado linfoplasmocitario en la mucosa del colon. Dicho infiltrado podría ser simplemente un hallazgo similar al que podemos encontrar en otros órganos en perros con ehrlichiosis. Sin embargo también cabe la posibilidad de que *E.canis* pueda actuar como antígeno a nivel de la mucosa colónica dando lugar a una colitis linfoplasmocitaria. Si bien son necesarios nuevos estudios al respecto, los procesos inflamatorios crónicos de intestino grueso podrían ser incluidos dentro del listado de cuadros asociados con ehrlichiosis canina.

En cuanto a los **síntomas** relacionados con el **aparato urinario**, obviamente, la clasificación de polidipsia y poliuria en este grupo es artificial, debido al gran número de procesos que pueden cursar con este síndrome. Sin embargo, debemos constatar que, prácticamente todos los casos que presentaban estos síntomas, tenían insuficiencia renal. La mayoría de los animales aún no tenían anorexia, conservando un estado general que no era excesivamente depauperado. El porcentaje de perros con vómitos es ligeramente inferior al de casos con sintomatología relacionada con el aparato urinario, lo cual podría considerarse lógico puesto que la presentación de vómitos ocasionales se ha

descrito, fundamentalmente, en perros con insuficiencia renal (Troy y Vulgamott, 1980; Woody y Hoskins, 1991).

Hasta hace poco, la única **sintomatología** relacionada con la piel eran petequias y equimosis en diferentes zonas (Walker et al, 1970; Troy y Vulgamott, 1980; Waddle y Littman, 1988; Perille y Matus, 1991). Tan solo en una serie de casos se habían encontrado algunos perros con alopecia y con dermatitis (Price et al, 1987), en los cuales se producía una mejoría clínica tras el tratamiento, si bien los autores la consideraban simplemente un reflejo de la evolución general de los pacientes.

En nuestro estudio el dato más sorprendente, sin duda alguna, es la alta frecuencia con la que se presentan síntomas cutáneos (38,01%). Recientemente se ha descrito en nuestra área geográfica un caso de ehrlichiosis asociado con problemas cutáneos y con remisión del cuadro tras la instauración de un tratamiento específico con dipropionato de imidocarb (Sagredo et al, 1994).

Los procesos cutáneos detectados han sido dermatitis localizadas en diferentes zonas, fundamentalmente en las regiones dorsal e inguinal, la cara interna de las extremidades y su tercio distal. Las lesiones eran, frecuentemente, alopécicas con un intenso eritema y descamación; también hemos encontrado lesiones de tipo papulo-pustulo-costrosas. En algunos casos las almohadillas plantares presentaban disqueratosis. Estas lesiones se asemejaban a las producidas por reacciones de hipersensibilidad y, de hecho, en algunos casos esta hipótesis se confirmó histológicamente. Estos fenómenos de hipersensibilidad podrían estar asociados con la existencia de una respuesta inmunitaria de tipo humoral exacerbada, fundamentalmente durante la fase crónica.

La presencia de **síntomas reproductores** en la ehrlichiosis canina no ha sido tomada en cuenta hasta hace relativamente poco tiempo (Woody y Hoskins, 1991). En cuanto a los machos hemos encontrado, esporádicamente, edema de escroto que solía

tener presentación aguda y, en ocasiones, era la causa por la que se acudía a la consulta. En un animal, en estado muy avanzado de la enfermedad, pudimos observar necrosis de escroto.

Además del escroto, se han descrito edemas en otras zonas orgánicas como las extremidades (Huxsoll, 1975; French, 1988; Bonnard y Dralez, 1990), pese a lo cual no hemos tenido oportunidad de observar ningún caso con esta sintomatología.

En las hembras la frecuencia de presentación de patología relacionada con el aparato reproductor no es muy elevada. Además, al igual que hemos encontrado perras con antecedentes de abortos, también otras habían parido varias veces sin problema alguno, por lo que no podemos sacar ninguna conclusión al respecto.

Los cuadros reproductores han mostrado una relación estadísticamente significativa con la existencia de síntomas urinarios y cutáneos, si bien serían necesarios nuevos estudios que confirmaran estos hechos.

5.1.3.ASOCIACION ENTRE LA SINTOMATOLOGIA Y OTROS FACTORES

Raza

La predisposición de la raza Pastor Alemán al padecimiento de formas crónicas severas ha sido descrita en diferentes trabajos experimentales (Huxsoll et al, 1970b; Buhles et al, 1974). En nuestro estudio, debido a la gran diversidad de razas en las que hemos encontrado ehrlichiosis, hemos tenido una gran dispersión de los resultados sin poder llegar a establecer relaciones significativas entre la sintomatología y la raza. Este hecho tampoco es de extrañar si tenemos en cuenta que los estudios clínicos al respecto

no han encontrado una relación directa entre ambos factores (Troy et al, 1980; Kuehn y Gaunt, 1985; Codner y Farris-Smith, 1986).

Sexo

La mayoría de las asociaciones encontradas entre diferentes síntomas y un determinado sexo no llegan a ser significativas por lo que deben ser estudiadas de un modo más profundo y con un mayor número de casos. Sin embargo, nos parece interesante comentar la especial predisposición de los machos (con una relación casi significativa) a presentar síntomas oftalmológicos, especialmente uveitis, y hemorragias.

Por otro lado, nuestros resultados sugieren la posible existencia de una asociación estadísticamente significativa entre la presentación de convulsiones y el sexo. A pesar de que la frecuencia de presentación de este síntoma es tan sólo de 4 casos, todos ellos se dan en hembras.

Edad

En cuanto a la edad, casi todas las asociaciones halladas se refieren a la presentación de síntomas generales en animales jóvenes. De hecho, nos encontramos una relación casi significativa entre este tipo de síntomas y el grupo de edad de 0 a 2 años. Así mismo, hemos observado relaciones similares entre este grupo de edad y anorexia, adelgazamiento y adinamia. Posiblemente en ello influya el hecho de que estos animales presentan, habitualmente, una gran vitalidad y dinamismo por lo que al verse afectados por este proceso, estos síntomas pueden detectarse de un modo mucho más claro que en animales adultos.

Por otro lado, también llama la atención que los 4 casos con convulsiones se presentaron en perros de 5 y 6 años.

Título de anticuerpos

Tal y como ya hemos comentado, el título de anticuerpos aumenta progresivamente durante el curso de la enfermedad (Greene y Harvey, 1984) por lo que, aunque no de un modo exacto, puede servirnos de referencia, junto con la hiperproteïnemia, para tener una idea aproximada del tiempo transcurrido desde la infección, orientándonos acerca de la fase de la enfermedad en que se sitúa cada caso clínico.

Tras analizar los 14 casos asintomáticos, los títulos de anticuerpos que presentaban eran, siempre, mayores de 1/640; en concreto, el 50% de ellos mostraban un título de 1/10240. En consecuencia, estos casos podrían incluirse en la fase subclínica de la enfermedad, en la que sólo se apreciarían alteraciones biopatológicas con elevados títulos de anticuerpos (Woody y Hoskins, 1991).

Por otra parte, de los 18 casos en los que únicamente se observaban síntomas generales, 7 de ellos tenían títulos inferiores a 1/2560, los cuales podrían haber sido detectados en fase aguda de la enfermedad. Los 11 restantes tenían títulos más altos por lo que podrían ser incluidos dentro de una forma crónica leve, en la cual suelen aparecer únicamente estos síntomas inespecíficos con una intensidad relativamente baja (Troy et al, 1980; Hibler et al, 1986; Gilbert et al, 1992).

Además, hemos encontrado una relación significativa entre la presentación de títulos de anticuerpos no demasiado elevados y ciertos síntomas como los neurológicos y, en concreto, la ataxia, si bien el número de casos no es lo suficientemente grande como para sacar conclusiones al respecto.

Por otro lado, la esplenomegalia se presenta, sobre todo, en perros con títulos

muy altos. Esto podría deberse a que la hiperplasia esplénica que se desarrolla en la ehrlichiosis necesita un cierto periodo de tiempo para poder ser detectada clínicamente.

También hemos encontrado que ciertos síntomas reproductores como la metrorragia y los abortos se han presentado casi exclusivamente en animales con tasas de anticuerpos muy elevadas, lo que podría significar que este tipo de síntomas pueden estar influidos por el tiempo transcurrido desde la infección y por la existencia de una respuesta inmunitaria muy acusada, pero inefectiva. De todos modos, es poco lo que se conoce al respecto de estos cuadros reproductores (Woody y Hoskins, 1991).

Por último, incluimos la existencia de una relación casi significativa ($p < 0.1$) entre petequias y hemorragias y títulos muy altos. Esta relación puede confirmar el hecho de que, aunque los síntomas hemorrágicos pueden presentarse tanto en fases agudas como crónicas, su frecuencia es mucho mayor en estas últimas (Troy y Forrester, 1990).

5.2. ESTUDIO BIOPATOLOGICO

5.2.1. HEMATOLOGIA

Serie roja

Aunque no existe alteración en el valor medio del número de glóbulos rojos respecto a los valores fisiológicos, es interesante interpretar nuestros resultados atendiendo a la clasificación de estos recuentos eritrocitarios.

De los 93 casos incluidos en nuestro estudio, 46 presentaron una cifra en el recuento de hematíes inferior a lo normal, lo que representa casi el 50%. De éstos, 7

casos presentaron una anemia marcada. La relación entre las alteraciones en el recuento de glóbulos rojos y el valor hematocrito y la hemoglobina es, lógicamente, clara. Estos resultados concuerdan con el estudio clínico, en el cual algo más del 35 % de los perros presentaban, a la exploración, palidez de mucosas. La diferencia existente entre estas dos frecuencias podría explicarse por el hecho de que aquellos animales que presentan anemias ligeras, posiblemente mostrarán una coloración normal en sus mucosas.

Los datos reflejados en nuestro trabajo arrojan una incidencia de anemia en perros con ehrlichiosis (49.46%) ligeramente inferior a la mostrada en diferentes estudios clínicos (Troy et al, 1980; Kuehn y Gaunt, 1985; Waddle y Littman, 1988). La selección de los casos en nuestro estudio estaba basada, fundamentalmente, en la seropositividad frente a *E.canis* por IFI. A diferencia de otros estudios, en el nuestro no todos los perros presentaban sintomatología clínica, por lo que éstos podrían estar padeciendo una forma subclínica; en esta fase subclínica, algunos trabajos no describen ningún caso de anemia (Codner et al, 1985), lo cual puede explicar que la frecuencia encontrada por nosotros sea inferior.

Como hemos comentado en el apartado de resultados, con el fin de conocer los tipos de anemias que pueden presentarse en animales con ehrlichiosis, hemos estudiado las posibles combinaciones de VCM y CMHC en los perros anémicos. Estos dos índices pueden ayudarnos, en ausencia del recuento de reticulocitos, a diferenciar entre anemias regenerativas y no regenerativas (Tvedten, 1994).

Los resultados nos muestran un claro predominio de anemias con VCM normal y CMHC normal (65.22% de los casos). Las anemias normocíticas y normocrómicas suelen ser de tipo no regenerativo; en estos casos no existe una cantidad suficiente de reticulocitos como para encontrar un VCM elevado o una CMHC disminuida.

La presencia de anemias no regenerativas es típica de la fase crónica de la

DISCUSION

ehrlichiosis debido, fundamentalmente, a la existencia de una hipoplasia o aplasia medular (Codner y Farris-Smith, 1986; Woody y Hoskins, 1991). Sin embargo, entre los casos con anemia normocítica y normocrómica también pueden encontrarse perros con hemorragias recientes, debido a que la médula ósea aún no ha tenido tiempo para responder.

El segundo gran grupo de anemias estaría formado por aquellas con VCM alto y CMHC baja (un 30.43% del total); se trata de anemias macrocíticas e hipocrómicas, es decir, las típicas anemias regenerativas que aparecen, preferentemente, en la fase aguda y, también, en fases crónicas leves debido a la destrucción de los hematíes por mecanismos inmunomediados (Reardon y Pierce, 1981).

Comparando la aparición de anemias regenerativas y no regenerativas con las de otros estudios se observa, en todos ellos, una predominancia de estas últimas, con una frecuencia de presentación similar a la nuestra (Troy et al, 1980; Kuehn y Gaunt, 1985; Waddle y Littman, 1988). En este sentido, nos parece interesante comentar que, pese a que clásicamente se relaciona a la ehrlichiosis con la existencia de anemias no regenerativas, la ausencia de este hallazgo no debe descartar la presencia de la enfermedad.

También debemos comentar la presentación de 2 casos de anemia con VCM bajo y CMHC baja, es decir, de anemia microcítica e hipocrómica. Los mecanismos patogénicos de estos procesos estarían relacionados con una deficiencia en hierro que motivaría una insuficiente producción de hemoglobina; este hecho puede aparecer en perros con ehrlichiosis que presentan una pérdida crónica de sangre.

Para terminar, el hecho de que entre un 5 y un 10% de los casos presenten valores mayores de lo normal en los 3 parámetros indicadores de la serie roja, puede estar directamente relacionado con el estado de excitación de los animales en el

momento de la extracción de sangre y, en algunos casos, con el grado de deshidratación. Este último dato se confirma por la existencia de recuentos de leucocitos y de plaquetas elevados.

Serie blanca

El recuento leucocitario es uno de los parámetros más variables en el curso de la ehrlichiosis canina (Hibler et al, 1986; Woody y Hoskins, 1991). En nuestro estudio, la mayoría de los animales (63.44%) presentaron unos valores dentro del rango fisiológico establecido. Pese a que se ha encontrado un porcentaje importante de leucocitosis, coincidiendo con otros autores (Kuehn y Gaunt, 1985; Waddle y Littman, 1988), es mucho más frecuente la leucopenia.

Dentro del recuento diferencial debemos distinguir entre los resultados obtenidos en el recuento absoluto y en el relativo para cada tipo concreto de leucocito.

Si comenzamos, únicamente, por observar los porcentajes obtenidos en el recuento diferencial, tanto de neutrófilos como de linfocitos, destacará por un lado la existencia de neutropenia relativa en cerca del 35% de los casos y, por otro, la presentación de linfocitosis relativa en más de la mitad de los casos estudiados. En principio, estos datos nos sugieren la existencia de un gran número de perros con la fórmula invertida o cercana a la inversión.

Sin embargo, la interpretación de estos datos variará ligeramente al estudiar los recuentos absolutos de neutrófilos y de linfocitos. En relación con los neutrófilos, la mayoría de los animales estudiados (72.04%) presentan unos valores totales incluidos dentro del rango fisiológico; tanto la neutrofilia (16.13%) como la neutropenia (11.83%) absolutas se pueden encontrar en un número bastante similar de perros. Comparando estos datos, con los obtenidos en el recuento diferencial relativo,

DISCUSION

observamos que el porcentaje de perros con neutrofilia se mantiene, pero un importante número de individuos con neutropenia relativa tienen recuentos totales de neutrófilos normales.

En el caso de los linfocitos, comparando el recuento total y el relativo, la frecuencia de animales linfopénicos permanece constante. Sin embargo y al igual que ocurría en el caso de la neutropenia, numerosos perros con linfocitosis relativa no presentan realmente linfocitosis absoluta.

Algunos autores han observado que la linfopenia absoluta se presenta más frecuentemente que la linfocitosis absoluta en perros con ehrlichiosis (Kuehn y Gaunt, 1985; Waddle y Littman, 1988); esta linfopenia estaría causada, fundamentalmente, por una hipoplasia medular (Hibler et al, 1986). Sin embargo, en nuestro estudio, la linfocitosis aparece más a menudo; este hecho podría explicarse por el predominio de linfocitosis e hiperproteinemia en perros, en fase crónica, en los que la médula ósea no esté aún gravemente afectada (Weiser et al, 1991).

En los recuentos tanto de eosinófilos como de monocitos, cabe destacar la existencia de eosinopenia y de monocitopenia. En cuanto a la eosinopenia, si bien hasta el momento existe un vacío de conocimiento en cuanto al mecanismo patogénico responsable, su frecuencia de presentación es muy elevada y similar a la hallada por diferentes investigadores (Waddle y Littman, 1988; Woody y Hoskins, 1991). La monocitopenia ha sido descrita esporádicamente en algunas series clínicas (Kuehn y Gaunt, 1985).

Teniendo en cuenta que los recuentos celulares se realizan sobre 100 leucocitos y que tanto los monocitos como los eosinófilos habitualmente presentan valores bajos, estas citopenias encontradas deberían ser consideradas tan solo parcialmente, confirmándose con recuentos de un mayor número de glóbulos blancos.

El porcentaje de perros con monocitosis absoluta es mínimo coincidiendo, en este sentido, con algunos autores (Waddle y Littman, 1988) y disintiendo con otros que encuentran porcentajes más altos (Troy et al, 1980; Kuehn y Gaunt, 1985).

Para terminar con el recuento diferencial, reseñaremos la ausencia de basofilia en nuestros casos, la cual también ha sido descrita aunque en baja frecuencia (Woody y Hoskins, 1991).

Plaquetas

Sin lugar a duda, la alteración hemática que hemos observado más comúnmente es la trombocitopenia, que se presenta en más del 80% de los casos. Para algunos autores, la incidencia de trombocitopenia en infección natural está sobreestimada debido a que la detección de la misma se ha empleado, en ocasiones, como paso previo para la determinación de anticuerpos frente a *E.canis* (Woody y Hoskins, 1991). En nuestra opinión, este problema ha influido en algún estudio concreto en el que se describe trombocitopenia en el 100% de los animales estudiados (Troy et al, 1980); no obstante, la elevada incidencia observada por otros autores, cercana al 80% de los casos (Waddle y Littman, 1988), es similar a la encontrada en nuestro estudio, en el cual el recuento de plaquetas no ha influido en modo alguno en la inclusión de perros en nuestra serie de casos. Por tanto, estas incidencias, pese a parecer exageradas, podrían reflejar con bastante exactitud a lo que ocurre, en realidad, en los perros con ehrlichiosis de presentación natural.

También es interesante observar cómo un elevado porcentaje de casos presentan recuentos plaquetarios inferiores a $50,000/\text{mm}^3$, algunos de los cuales no presentan sintomatología hemorrágica; estos recuentos no siempre se han correlacionado con la presentación de tales síntomas. Este hecho, junto con la aparición de hemorragias en perros con recuentos normales, puede llevarnos a la conclusión de que la presentación

de estos cuadros en perros con ehrlichiosis puede ser debida a la existencia no tanto de trombocitopenias como de alteraciones en la funcionalidad plaquetaria (Kuehn y Gaunt, 1985; Woody y Hoskins, 1991).

Pancitopenias y bicitopenias

La existencia de pancitopenia en un 15.05% de los casos estudiados supone una frecuencia de presentación similar a la mostrada por diferentes trabajos clínicos (Kuehn y Gaunt, 1985; Woody y Hoskins, 1991); este hallazgo es típico de la fase crónica de la ehrlichiosis y se relaciona con un estado de hipoplasia o aplasia medular (Troy et al, 1980; Waddle y Littman, 1988). En este sentido, en nuestro trabajo no hemos encontrado predisposición alguna de la raza pastor alemán, en contraste con lo referido por otros autores (Buhles et al, 1974).

Si analizamos con detenimiento todas las combinaciones posibles en relación con las citopenias, observaremos que la leucopenia en ningún caso se presenta de un modo aislado, sino que lo hace fundamentalmente en las pancitopenias, o bien, acompañando únicamente a la trombocitopenia. Ante esto, cabe la suposición de que en casos de hipoplasia medular, la serie blanca sea la última en verse afectada, lo cual podría explicar la variabilidad encontrada en el recuento leucocitario, en comparación con el resto de líneas celulares (Troy y Forrester, 1990). El hecho de que, en nuestro estudio, los perros con títulos de anticuerpos muy elevados, tiendan a presentar anemia y trombocitopenia y, sin embargo, no se pueda encontrar ninguna relación estadísticamente significativa con los recuentos de glóbulos blancos podría apoyar esta hipótesis.

También sorprende que, en ningún caso, se haya detectado la concurrencia de anemia y leucopenia exclusivamente, lo que podría deberse a que la trombocitopenia es, de todos estos hallazgos, el más frecuente. Igualmente debe ser tomada en cuenta la

posibilidad de que las plaquetas sean las células más susceptibles en aquellos casos en los que la ehrlichiosis cursa con hipoplasia medular.

5.2.2. BIOQUIMICA SANGUINEA

Entre los hallazgos encontrados en la analítica sanguínea de perros con ehrlichiosis ha sido destacada, por diferentes autores, la presencia de hiperproteinemia, que puede aparecer en cualquiera de las fases de esta enfermedad (Burghen et al, 1971; Buhles et al, 1974; Weisiger et al, 1975; Troy et al, 1980; Kuehn y Gaunt, 1985; Codner y Farris-Smith, 1986; Davoust et al, 1991; Weiser et al, 1991). Esta hiperproteinemia suele ser causada por una hiperglobulinemia por lo que no es de extrañar que, en los diferentes estudios clínicos realizados, las frecuencias de presentación de ambas sean similares, con unos valores cercanos al 30-40 % de los perros enfermos (Troy et al, 1980; Kuehn y Gaunt, 1985; Waddle y Littman, 1988).

Los valores en nuestra población, para estos dos parámetros, también son muy parecidos, lo que puede confirmar esa relación directa entre ambos. Sin embargo, nos hemos encontrado unas frecuencias de presentación, tanto de hiperproteinemia como de hiperglobulinemia, superiores a las descritas por los autores citados anteriormente. No obstante, los resultados hallados en la bibliografía no son homogéneos e incluso, en perros en fase crónica con sintomatología clínica, se ha detectado hiperproteinemia en el 100% de los casos (Weiser et al, 1991).

Además y debido a que el criterio de selección en nuestro estudio se basaba, fundamentalmente, en el diagnóstico inmunológico y no en la sintomatología, los animales asintomáticos que se encuentran en fase subclínica han sido incluidos en el mismo. Esta fase se caracteriza por la presentación de alteraciones biopatológicas, entre las que destaca la existencia de hiperproteinemia (Ghorbel et al, 1993b). La

introducción de estos casos en nuestro trabajo podría haber incrementado la frecuencia de hiperproteinemia e hiperglobulinemia.

La magnitud de la hiperproteinemia en nuestra población ha sido grande observándose, en algunos sueros, incluso más de 14.4 g/dl de proteínas totales. Estas hiperproteinemias tan elevadas, motivadas por hiperglobulinemias, se han asociado a la existencia de infecciones de larga duración (Ristic et al, 1972; Weisiger et al, 1975), lo que sugiere que un gran número de los casos de este estudio se englobarían en fases subclínicas o en fases crónicas.

Se ha postulado la ausencia de una asociación directa entre el título de anticuerpos y la hiperglobulinemia en perros con ehrlichiosis (Burghen et al, 1971; Ristic et al, 1972; Weisiger et al, 1975; Ghorbel et al, 1993). En nuestro estudio, los perros con títulos muy elevados (1/10240) tienden a presentar hiperglobulinemia y, más concretamente, hipergammaglobulinemia; no obstante, aunque hemos observado esta relación altamente significativa ($p < 0.001$), la fórmula matemática que correlaciona estos dos parámetros presenta importantes desviaciones.

La hipoproteinemia sólo ha aparecido, al igual que en otros trabajos (Kuehn y Gaunt, 1985), de un modo esporádico asociándose, en todos los casos, a hipoalbuminemia en perros con valores de globulinas normales o bajos.

Esta hipoalbuminemia se ha descrito en diferentes fases de la ehrlichiosis (Burghen et al, 1971; Harvey et al, 1979; Codner et al, 1986; Davoust et al, 1991), asociándose fundamentalmente a la existencia de proteinuria (Codner y Maslin, 1992). En nuestro estudio, cerca del 40% de los perros controlados presentaban una disminución en la concentración de albúmina, dato similar al ya reseñado por distintos autores (Kuehn y Gaunt, 1985; Waddle y Littman, 1988).

En relación con las diferentes fracciones de globulinas, los niveles de alfa-globulinas pueden aumentar, de un modo transitorio, en la fase aguda para luego descender hasta valores normales (Burghen et al, 1971). También se ha descrito su incremento en la fase crónica, en presencia de una gammapatía policlonal (Harvey et al, 1979; Ghorbel et al, 1993b). Sin embargo, su incidencia no es reseñable alcanzando, en nuestra serie, el 5% de los casos. En 3 de ellos, este aumento acompañaba al de otras fracciones globulínicas en perros con hiperproteïnemia; sin embargo, en los 2 restantes, ambos con un título de anticuerpos bajo, únicamente se detectó en el estudio electroforético de las proteínas, un aumento de la fracción alfa, en concreto de la alfa-2-globulina. Por tanto, en perros en fase aguda en los que el título de anticuerpos puede ser dudoso, la detección de un aumento en esta fracción podría ser un dato útil de cara al diagnóstico.

Los resultados obtenidos en relación con las beta y gamma globulinas indican que la fracción que con mayor frecuencia se incrementa en perros con ehrlichiosis es la gamma (en más del 83% de los casos), ya que es en dicha fracción en la que se encuadran muchos de los anticuerpos producidos en el curso de la infección. Pese a que en la mayoría de los perros con hipergammaglobulinemia existía una hiperproteïnemia, 5 de ellos presentaban valores normales de proteínas totales, debido a la presentación conjunta de hipoalbuminemias severas.

El hecho de que en todos los casos con aumento de las beta-globulinas, éste se acompañe de una hipergammaglobulinemia, subraya la alta frecuencia con la que se puede detectar una gammapatía policlonal en esta enfermedad (Harvey et al, 1979; Kuehn y Gaunt, 1985; Ghorbel et al, 1993b). No obstante, en 6 casos hemos detectado, en la fracción beta-gamma, gammapatías monoclonales compatibles con aumentos de IgG, los cuales han sido descritos, más raramente, en fases crónicas (Hoskins et al, 1983; Breischwerdt et al, 1987; Matus et al, 1987).

Debido a la existencia tanto de hipoalbuminemia como de hiperglobulinemia en perros con ehrlichiosis, no es de extrañar que cerca del 90% de los casos incluidos en nuestro estudio presenten un cociente albúmina/globulina inferior al normal. Una vez analizadas todas las alteraciones encontradas en relación con las proteínas totales y debido a la elevada frecuencia con la que se detectan, la realización de un proteinograma podría ser un instrumento de apoyo importante en el diagnóstico de la ehrlichiosis canina.

En cuanto a la funcionalidad hepática, en ocasiones se observa un aumento, fundamentalmente, de la ALT que a veces se acompaña de hiperbilirrubinemia (Troy y Forrester, 1990). La frecuencia encontrada en nuestro estudio, en cuanto a la GPT, es similar a la encontrada por otros autores (Troy et al, 1980); sin embargo, en nuestro caso hemos observado hiperbilirrubinemia en un porcentaje de casos mayor, si bien esta hiperbilirrubinemia era leve en la mayoría de los casos.

Pese a que el aumento de la ALT y de la bilirrubina era detectado en 18 y 27 ocasiones respectivamente, el incremento simultáneo de ambos solo se producía en 8 casos (8.60% del total); esta baja incidencia podría deberse a que estas alteraciones tienen lugar, sobre todo, durante la fase aguda (Troy y Forrester, 1990).

La funcionalidad renal también puede verse comprometida en perros con ehrlichiosis. En nuestro caso, los aumentos en la urea y la creatinina por encima de los valores normales se han detectado en un porcentaje de perros parecido al indicado en otros estudios (Kuehn y Gaunt, 1985; Troy y Forrester, 1990).

Al igual que ocurría con los parámetros hepáticos, el número de animales que presentan un incremento simultáneo de la urea y de la creatinina es bajo, en concreto, 7 casos (un 7.53% del total). Estos aumentos podrían tener un origen prerrenal (en deshidratación) o renal (debido a la existencia de glomerulonefritis y plasmocitosis

intersticial renal) (Troy et al, 1980; Breitschwerdt et al, 1987). En nuestro estudio, los 7 perros con valores elevados de urea y creatinina presentaban proteinuria e hipoalbuminemia por lo que probablemente el origen de la insuficiencia renal estuviera relacionado con la existencia de una glomerulonefritis inmunomediada. Esta podría ser una manifestación más de la exacerbada respuesta inmunitaria que tiene lugar durante la fase crónica de la enfermedad (Codner et al, 1992).

Los niveles de glucemia se encuentran, en casi todos los casos, dentro del rango fisiológico por lo que, en principio, a este parámetro no debe otorgársele demasiada importancia en perros con ehrlichiosis.

5.2.3. URIANALISIS

De todos los resultados obtenidos en el urianálisis destacan, por su mayor frecuencia, la proteinuria y la hematuria, si bien, y coincidiendo con otros autores, éstas se han presentado tanto en presencia como en ausencia de uremia (Troy et al, 1980).

Especialmente importante nos parece el hecho de que más del 45 % de los perros con ehrlichiosis presenten proteinuria. La detección de 12 casos de proteinuria en un total de 18 perros con infección natural es el único dato clínico concreto encontrado, en este sentido, en la bibliografía consultada (Troy et al, 1980). En perros infectados experimentalmente, también se detectó proteinuria, aunque sólo durante la fase aguda (Codner y Maslin, 1992). En dicho estudio, se consideraba que esta proteinuria podía ser un factor decisivo para la existencia de hipoalbuminemia en perros con ehrlichiosis, si bien se consideraba necesaria la realización de nuevas investigaciones en otras fases de la enfermedad.

En nuestro trabajo hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre la presencia de proteinuria y de hipoalbuminemia, lo cual viene a reforzar esta hipótesis. Además, en nuestros casos, la proteinuria se presenta, fundamentalmente, en casos con títulos de anticuerpos superiores a 1/1280, los cuales suelen aparecer con mayor frecuencia en fases subclínicas y crónicas. Por todo ello, estos hallazgos nos hacen coincidir con otros autores en cuanto a que la proteinuria y la hipoalbuminemia pudieran estar relacionadas con la existencia de lesiones glomerulares inmunomediadas (Troy y Forrester, 1990; Breitschwerdt, 1995).

En cuanto a la hematuria, comenzaremos comentando que la mayoría de los perros presentaban una orina macroscópicamente normal. El hecho de que hayamos encontrado una asociación de la hematuria con la hipoalbuminemia puede indicarnos que este dato también podría estar de algún modo relacionado con la lesión renal. Además, la existencia de trombocitopenia no influye en modo alguno en la existencia de hematuria, según los resultados de nuestro estudio.

En cuanto a la densidad urinaria, en 7 casos era isostenúrica; todos ellos presentaban valores de urea y creatinina elevados y además en su orina se detectaba proteinuria; los títulos de anticuerpos eran superiores a 1/1280. Estos datos nos hacen suponer la existencia, en estos casos, de lesión renal importante en el transcurso de la fase crónica de esta enfermedad.

El pH se hizo alcalino únicamente en 7 casos, en los que se detectó bacteriuria la cual podía explicar este hecho.

El sedimento urinario no ha sido estudiado, hasta el momento, en profundidad en perros con ehrlichiosis (Kuehn y Gaunt, 1985). Debido a la elevada frecuencia de presentación de proteinuria y hematuria, es lógico que nos encontremos, en un 35.48% de los casos, sedimentos considerados como patológicos. Entre todos los hallazgos ya

descritos en el apartado de resultados, destaca la presencia de células de pelvis y de túbulo renales, lo cual puede concordar con lo ya expresado en cuanto a la existencia de lesiones renales en el curso de la ehrlichiosis canina.

5.2.4. DIAGNOSTICO ETIOLOGICO

Tanto las mórulas como los cuerpos elementales no se detectan en un gran número de perros con ehrlichiosis; para algunos autores el total de células mononucleares infectadas es inferior al 1% (Cowell et al, 1988; French, 1988).

En nuestro estudio, las mórulas sólo han podido ser identificadas en un único caso, lo que supone una frecuencia de presentación del 1.08%, similar a la encontrada en otros trabajos (Kuehn y Gaunt, 1985; Woody y Hoskins, 1991). Sin embargo, los cuerpos elementales se han detectado en un porcentaje mayor (20.43%). Todas las referencias al respecto indican que es mucho más frecuente observar cuerpos elementales que mórulas (Troy et al, 1980; Kuehn y Gaunt, 1985; Troy y Forrester, 1990; Woody y Hoskins, 1991)

Aunque la observación de cuerpos elementales suele ser muy rara (Kuehn y Gaunt, 1985; Troy y Forrester, 1990), algunos autores han llegado a ver estas inclusiones en más del 80% de los casos estudiados (Elias, 1993). Este dato tan elevado tendría explicación si pensamos que los cuerpos elementales pueden confundirse, en algunos casos, con los gránulos azurófilos normales que a veces aparecen en los linfocitos.

La detección tanto de mórulas como de cuerpos elementales se describe, principalmente, durante la fase aguda, ya que es durante la misma cuando nos encontramos una mayor presencia de estas formas de *E.canis* en sangre,

fundamentalmente en perros febriles (Troy et al, 1980; Hibler et al, 1986; Du Plessis et al, 1990). Por ello, es lógico que encontremos una relación estadísticamente significativa entre la ausencia de estas inclusiones y la existencia de títulos de anticuerpos muy elevados (1/10240) compatibles con fases crónicas de la enfermedad. No obstante, esta asociación no descarta la observación de inclusiones en perros con título altos o en fases crónicas; de hecho, el único caso en el que vimos mórulas presentaba un título de 1/5120.

5.3. ENSAYO TERAPEUTICO

5.3.1. RESPUESTA CLINICA

El primer comentario que debemos realizar es que los tres protocolos empleados en nuestro estudio dan lugar a una buena respuesta clínica en perros con ehrlichiosis.

Los datos referidos a la resistencia al tratamiento encontrados en la bibliografía son muy escasos; en perros con ehrlichiosis tratados con una única dosis de dipropionato de imidocarb, el 16.1% de los animales no respondían al tratamiento (Adeyanju y Aliu, 1982). En nuestro estudio, tan sólo aproximadamente un 6% de los casos tratados no respondieron a la terapia instaurada. Estos casos presentaban insuficiencia renal y/o aplasia medular, cuadros en los que el pronóstico suele ser desfavorable (Greene y Harvey, 1984; Woody y Hoskins, 1991).

La discordancia existente entre las distintas referencias en cuanto a la eficacia terapéutica tanto de la doxiciclina como del imidocarb podría atender a diferencias en la sensibilidad de diferentes cepas de *Ehrlichia* según el área geográfica (Villemin et al, 1984); de ahí la importancia de conocer la respuesta al tratamiento en cada zona concreta.

En los perros resistentes al tratamiento, decidimos cambiar de protocolo, tal y como hemos explicado en el apartado de materiales y métodos, si bien los resultados fueron, en general, decepcionantes. Tan solo en uno de los perros tratados inicialmente con doxiciclina observamos una respuesta favorable al cambiar a dipropionato de imidocarb. A pesar de este hecho, debido al reducido número de casos resistentes que hemos tenido ocasión de controlar y dado el mal pronóstico en este tipo de pacientes, no desaconsejamos, como última medida, el cambio de protocolo cuando no observamos una mejoría clínica y, más aún, si el protocolo inicial ha consistido en doxiciclina.

Debemos tener en cuenta que, según algunos autores, la respuesta favorable al tratamiento puede tardar incluso 6 semanas en aparecer, sobre todo, en formas crónicas (Woody y Hoskins, 1991) por lo que no debemos precipitarnos en nuestras decisiones en estos casos.

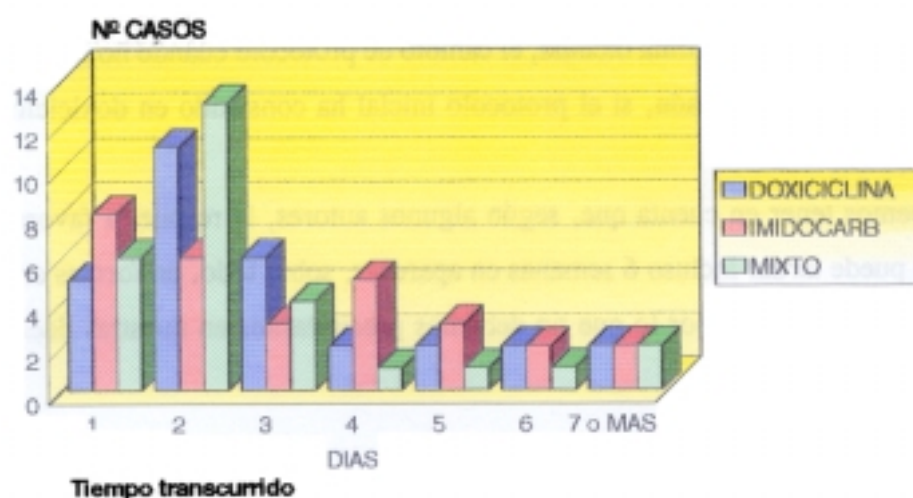
En relación con aquellos perros que responden al tratamiento, no hemos detectado diferencias significativas entre los tres protocolos empleados en cuanto al tiempo que tarda en aparecer la mejoría clínica siendo, en principio, cualquiera de ellos válido. Sin duda alguna e independientemente de la terapia empleada, hemos observado cómo los animales con epistaxis suelen mejorar en un periodo muy breve (1-2 días). Algo similar ocurre con aquellos casos en los que la sintomatología clínica es inespecífica; teóricamente estos casos podrían encuadrarse en formas agudas o crónicas leves, las cuales mejoran en 24-48 horas (Troy y Forrester, 1990), tal y como hemos observado en nuestro estudio (fig.43).

Casi todos los casos en los que la respuesta terapéutica tardó en aparecer más de 7 días, presentaban un cuadro clínico cutáneo con elevados títulos de anticuerpos. En dos de estos perros no se observó una mejoría evidente hasta pasado un mes del inicio del tratamiento. Previsiblemente los casos que tardan más días en mejorar se

deben encuadrar en fases crónicas de la enfermedad (Woody y Hoskins, 1991), lo cual vendría a apoyar la hipótesis de que los cuadros dermatológicos se producen en estas fases, posiblemente como consecuencia de un estímulo antigénico exacerbado y prolongado en el tiempo.

Fig.43. RESPUESTA CLINICA FAVORABLE

MEJORIA CLINICA



En aquellos casos que presentaban alteraciones biopatológicas, la mejoría clínica siempre precedía en el tiempo a la normalización de los valores hematológicos, tal y como ya ha sido señalado por otros autores (Troy y Forrester, 1990).

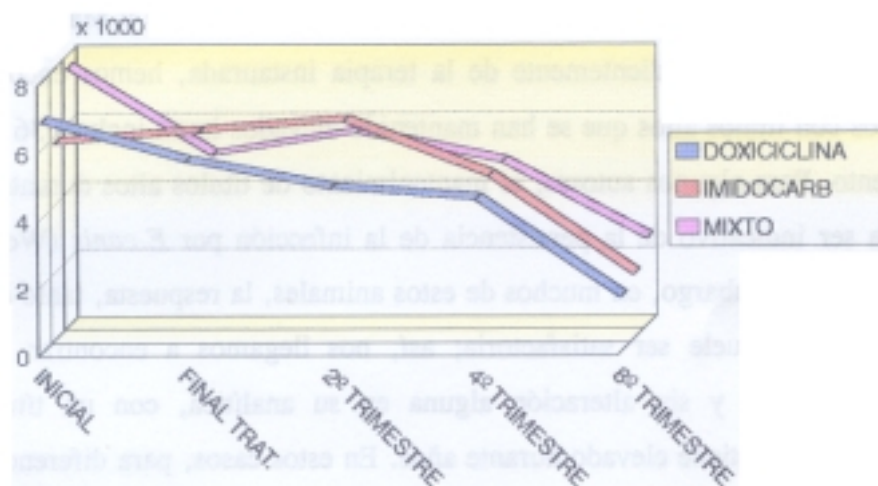
También queremos resaltar cómo en un perro incluido en el protocolo terapéutico mixto obtuvimos una respuesta tanto clínica como biopatológica favorable, reapareciendo nuevamente el mismo cuadro a los 3 meses post-tratamiento; de nuevo se instauró la misma pauta, evidenciándose una mejoría tanto en la clínica como en la analítica. En este caso, no nos consta la existencia de una nueva infestación por garrapatas, si bien ésta no se puede descartar. Algunos autores también han encontrado casos similares sin poder discernir si se trata de reinfecciones o de recaídas (Van Heerden e Immelman, 1979).

5.3.2. EVOLUCION BIOPATOLOGICA POST-TRATAMIENTO

Título de anticuerpos

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo muestran que, con los tres protocolos empleados, se consigue un lento y paulatino descenso en el título de anticuerpos (fig.44). En principio, mediante el análisis de varianza realizado, no existen diferencias, en la evolución existente, para cada uno de los protocolos con respecto a los otros dos. Con las tres pautas, las diferencias significativas con respecto al título inicial aparecen en el 8º trimestre.

Fig.44. EVOLUCION DEL TITULO ANTICUERPOS



Algunos autores, para medir la eficacia terapéutica, creen necesario realizar un control de inmunofluorescencia o de Western-blot 2 ó 3 semanas después de finalizar el tratamiento y, si en ese momento el título no baja ostensiblemente, recomiendan tratar de nuevo (Iqbal y Rikihisa, 1994). Estas conclusiones las han extraído dichos

investigadores al observar que, en infecciones experimentales, el título de anticuerpos, que inicialmente no era muy elevado, descendía a los 21-35 días. En nuestra opinión, tales resultados no deben generalizarse ya que, en infecciones naturales como las estudiadas por nosotros, la evolución del título es mucho más lenta y progresiva.

El título desciende aproximadamente a los 6-9 meses y, en ocasiones, ya no es detectable a los 12 meses (Buhles et al, 1974; Weisiger et al, 1975). En nuestro caso, únicamente hemos apreciado títulos negativos en aquellos perros que antes del tratamiento presentaban títulos inferiores a 1/2560. Estos datos coinciden con los mostrados por otros autores que, después del tratamiento, observan una muy lenta disminución en el título de anticuerpos, si bien más difícilmente logran hacerlos negativos (Davoust et al, 1991; Ghorbel et al, 1993a).

En algunos animales se ha observado una persistencia de anticuerpos específicos entre 15 y 31 meses después de ser tratados con tetraciclinas (Perille y Matus, 1991). En nuestro estudio, independientemente de la terapia instaurada, hemos encontrado algunos sueros con títulos altos que se han mantenido elevados hasta incluso 36 meses post-tratamiento. Para algunos autores, el mantenimiento de títulos altos durante 9-12 meses podría ser indicativo de la persistencia de la infección por *E.canis* (Woody y Hoskins, 1990). Sin embargo, en muchos de estos animales, la respuesta, tanto clínica como biopatológica, suele ser satisfactoria; así, nos llegamos a encontrar perros clínicamente normales y sin alteración alguna en su analítica, con un título de anticuerpos que se mantiene elevado durante años. En estos casos, para diferenciar un animal curado de un portador crónico, un buen método puede ser la persistencia de otras anomalías como la hipergammaglobulinemia o la trombocitopenia (Buhles et al, 1974). En procesos crónicos, *E.canis* es capaz de inducir el desarrollo y la selección preferente de una población clonal de células plasmáticas, las cuales podrían seguir estimuladas, por alteración del sistema inmunitario, incluso tras la desaparición de la infección (Weiser et al, 1991), si bien son necesarias nuevas investigaciones al respecto.

Proteinograma

Las alteraciones en el proteinograma en el curso de la ehrlichiosis canina han sido ampliamente descritas (Harvey et al, 1979; Kuehn y Gaunt, 1985; Breitschwerdt et al, 1987; Ghorbel et al, 1993). En nuestro estudio hemos incluido la evolución post-tratamiento del cociente albúmina/globulinas, de los niveles de albúmina y de la fracción gamma globulínica (fig.45-47).

Fig.46. EVOLUCION ALBUMINAS

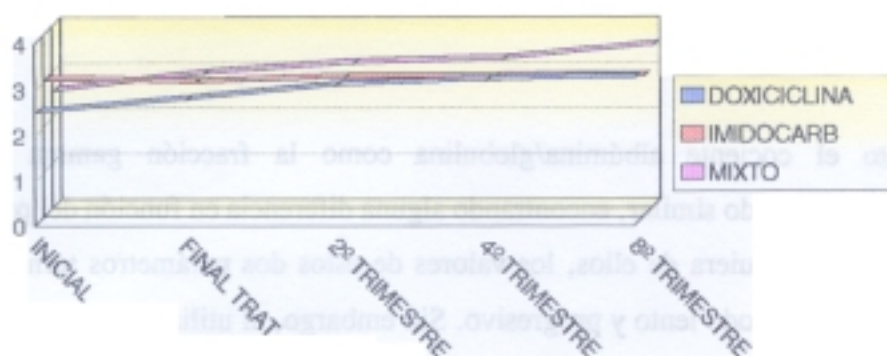
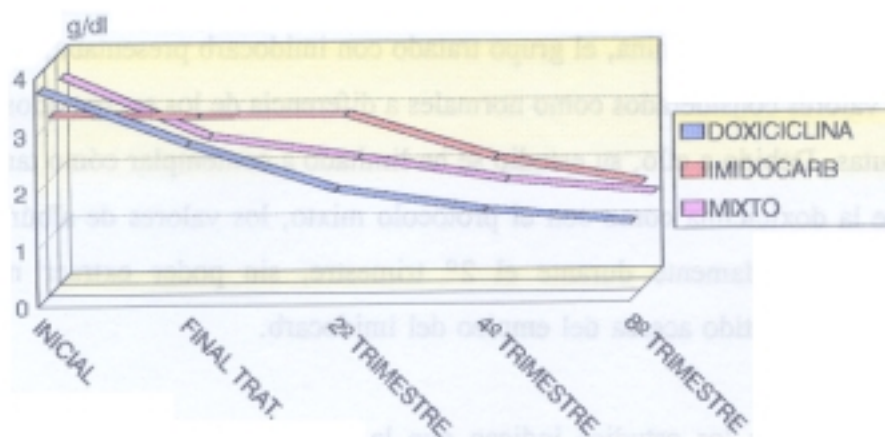
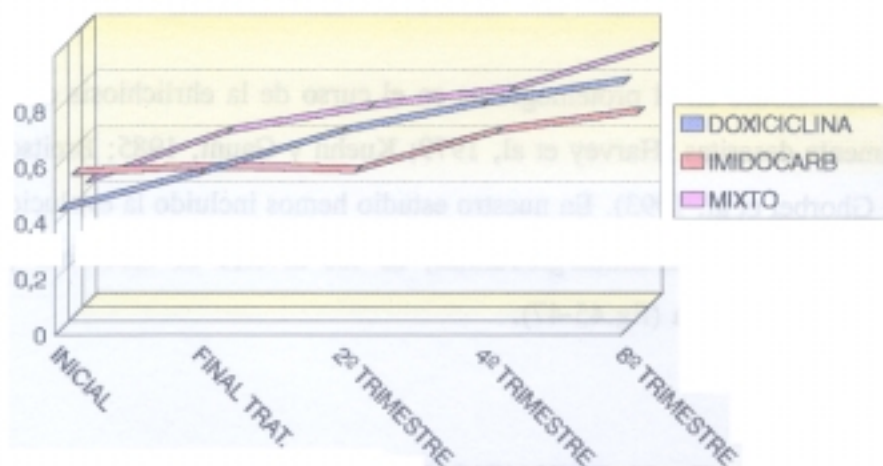


Fig.46. EVOLUCION GAMMA-GLOBULINAS



EVOLUCION DEL COCIENTE ALB/GLO



Tanto el cociente albúmina/globulina como la fracción gamma se han comportado de un modo similar, encontrando alguna diferencia en función del protocolo empleado. Con cualquiera de ellos, los valores de estos dos parámetros terminan por normalizarse de un modo lento y progresivo. Sin embargo, al utilizar tanto el protocolo mixto como la doxiciclina, esta normalización se produce más precozmente (durante el 2º trimestre post-tratamiento) que cuando se emplea dipropionato de imidocarb (en el 8º trimestre).

En el caso de la albúmina, el grupo tratado con imidocarb presentaba, antes del tratamiento, valores considerados como normales a diferencia de los encontrados en las otras dos pautas. Debido a ello, su estudio se ha limitado a contemplar cómo tanto con el empleo de la doxiciclina como con el protocolo mixto, los valores de albúmina se normalizan aproximadamente durante el 2º trimestre, sin poder extraer ninguna conclusión en este sentido acerca del empleo del imidocarb.

La mayoría de los estudios indican que la normalización tanto del cociente

albúmina/globulinas como de las diferentes fracciones proteicas tiene lugar de un modo progresivo entre los 3 y 9 meses post-tratamiento (Buhles et al, 1974; Greene y Harvey, 1984; Perille y Matus, 1991; Greene, 1995). Estos datos coinciden con los encontrados en nuestro trabajo, aunque también hemos observado algún caso aislado en el que la alteración en el proteinograma persistió a lo largo de todos los controles (hasta el 8º trimestre). En en estos perros el título de anticuerpos se mantuvo elevado, hecho que podría explicarse por la ineficacia del tratamiento (Buhles et al, 1974).

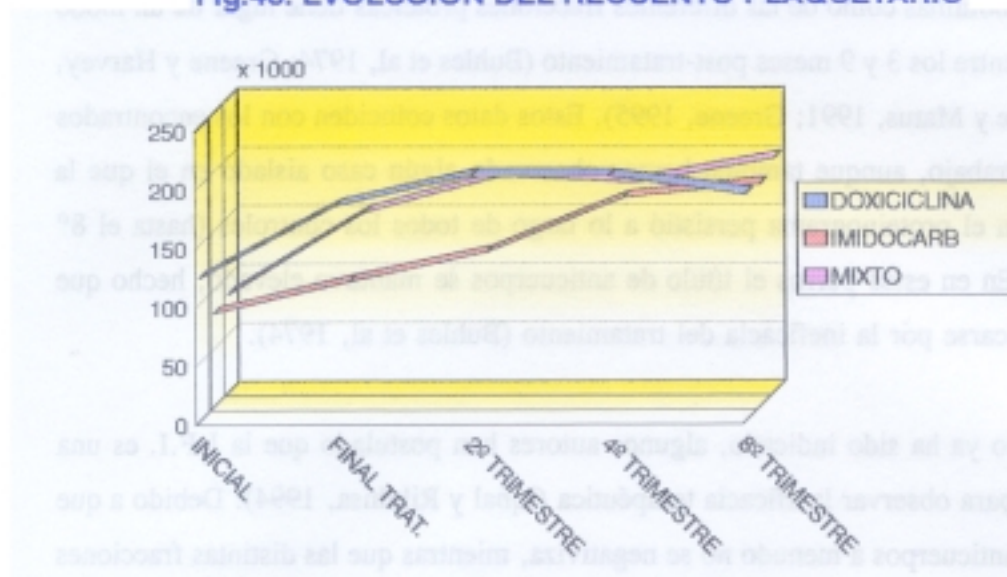
Como ya ha sido indicado, algunos autores han postulado que la I.F.I. es una técnica útil para observar la eficacia terapéutica (Iqbal y Rikihisa, 1994). Debido a que el título de anticuerpos a menudo no se negativiza, mientras que las distintas fracciones proteicas sí lo suelen hacer, en nuestra opinión el proteinograma es una técnica de mayor utilidad en el control de la evolución de animales tratados.

Recuento plaquetario y eritrocitario

En general, la respuesta clínica precede en el tiempo a la normalización de los parámetros biopatológicos (Troy y Forrester, 1990). El momento en el que van a desaparecer las alteraciones en la analítica depende, fundamentalmente, del estado de la médula ósea, si bien éste no es un factor totalmente determinante para predecir ese periodo de tiempo (Woody y Hoskins, 1991). Puesto que tanto el recuento eritrocitario como el plaquetario suelen llevar una evolución paralela tras la instauración de un tratamiento específico, ambos han sido estudiados conjuntamente.

En el recuento plaquetario de nuestros perros (fig.48), la respuesta ha sido rápida apreciándose normalmente en la 1ª semana, un ligero aumento en el mismo, tal y como ya ha sido señalado por otros autores (Buhles et al, 1974). No obstante, un reducido número de casos no experimentaron modificación alguna en su recuento hasta pasados incluso 30 días.

Fig.48. EVOLUCION DEL RECUENTO PLAQUETARIO

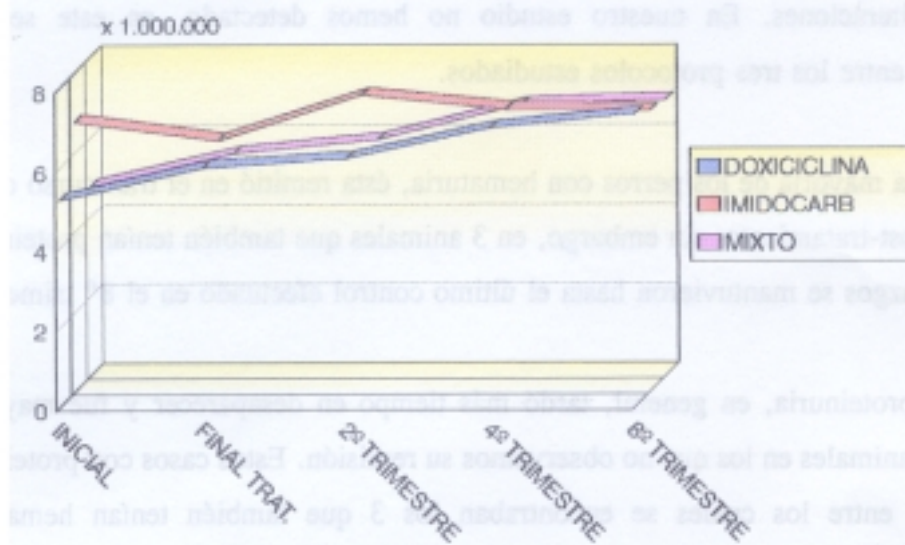


La normalización de dicho recuento se produjo paulatinamente hasta alcanzar unos valores fisiológicos al finalizar el tratamiento (aproximadamente 30 días), tanto en el caso de la doxiciclina como en el del protocolo mixto. Si bien tanto para la doxiciclina como para el protocolo mixto, las diferencias respecto del recuento inicial se hicieron significativas durante el 2º trimestre, para el dipropionato de imidocarb este hecho se produjo algo más tarde.

En relación con el recuento eritrocitario (fig.49), no podemos valorar la eficacia del imicocarb puesto que, en ese grupo, los valores medios previos a la instauración del tratamiento eran normales. La respuesta terapéutica en los perros que presentaron anemia también fue rápida en la mayoría de los casos; en la 1ª-2ª semana ya se detectaban ligeros aumentos. Al igual que hemos comentado para el recuento plaquetario, tan sólo un escaso número de animales presentaron valores similares a los iniciales hasta, incluso, 30 días después del inicio del tratamiento. Estos casos con una respuesta tardía tenían simultáneamente anemia y trombocitopenia, por lo que ambas alteraciones podrían estar relacionadas con la existencia de hipoplasia o aplasia medular,

en cuyo caso el pronóstico suele ser desfavorable (Woody y Hoskins, 1991). La anemia y la trombocitopenia comenzaron a recuperarse al mismo tiempo, presumiblemente, por la progresiva resolución del daño medular presente hasta ese momento.

Fig.49. EVOLUCION DEL RECuento GLOBULOS ROJOS



En el caso del recuento de hematíes, tanto la doxiciclina como el protocolo mixto mostraron una eficacia similar presentándose, en ambos casos, diferencias significativas respecto del control inicial en el 4º trimestre; independientemente del protocolo empleado, la anemia desapareció 30 días después del inicio del tratamiento. Hasta el momento, las referencias encontradas al respecto, indican que este recuento suele tardar 3-4 días en comenzar a recuperarse en el caso de las tetraciclinas (Price y Dolan, 1980) e incluso 1 mes en el caso del imidocarb (Adeyanju y Aliu, 1982). En nuestra opinión, esta diferencia en los resultados puede deberse, en unos casos, al bajo número de perros controlados y, en otros, a que la respuesta diferirá en función de la fase en la que se instaure el tratamiento.

Urianálisis

Aunque en varias referencias se describe la existencia de hematuria y proteinuria en perros con ehrlichiosis (Troy et al, 1980; Troy y Forrester, 1990; Breitschwerdt, 1995), no hemos encontrado ningún dato relacionado con la evolución post-tratamiento de estas alteraciones. En nuestro estudio no hemos detectado, en este sentido, diferencias entre los tres protocolos estudiados.

En la mayoría de los perros con hematuria, ésta remitió en el transcurso del 2º trimestre post-tratamiento; sin embargo, en 3 animales que también tenían proteinuria, ambos hallazgos se mantuvieron hasta el último control efectuado en el 8º trimestre.

La proteinuria, en general, tardó más tiempo en desaparecer y fue mayor el número de animales en los que no observamos su remisión. Estos casos con proteinuria persistente, entre los cuales se encontraban los 3 que también tenían hematuria, presentaban hipoalbuminemia, probablemente motivada por la presentación de lesiones glomerulares inmunomediadas (Troy y Forrester, 1990; Breitschwerdt, 1995) que no desaparecen pese a la instauración de tratamientos específicos.

Detección de cuerpos de inclusión de *E.canis*

Como ya hemos comentado con anterioridad, la detección de estos cuerpos de inclusión no suele ser demasiado frecuente (Troy et al, 1980; Hibler et al, 1986; Du Plessis et al, 1990), por lo que el hecho de no ser observados no nos permitirá extraer conclusión alguna sobre la existencia o la ausencia de infección.

Aunque son escasas las referencias sobre la detección de estos cuerpos de inclusión tras el tratamiento, las existentes indican que suelen desaparecer de los

leucocitos aproximadamente a los 10-14 días (Winkler et al, 1988; Elias, 1991). En nuestro estudio, dada la baja frecuencia de presentación de estas inclusiones, no hemos podido encontrar ninguna diferencia entre los tres protocolos estudiados en relación con el momento en que éstas desaparecen de sangre circulante. Independientemente de la terapia empleada, el momento en que dejaron de observarse fue, en la mayoría de los casos tras la finalización del tratamiento.

Mención especial merece un caso tratado con dipropionato de imidocarb en el que persistieron las inclusiones hasta el segundo trimestre; en este caso, también continuaban presentes diferentes alteraciones biopatológicas que nos indicaron la existencia de una respuesta inefectiva al tratamiento. La detección continuada de cuerpos de inclusión de *E.canis* tras la instauración de un protocolo terapéutico deberá hacernos pensar la posibilidad de que el mismo no haya surtido el efecto esperado.

5.3.3. RESUMEN DE LA EFICACIA TERAPEUTICA

Tras analizar detenidamente los resultados obtenidos en nuestros ensayos terapéuticos, podemos afirmar que no existen diferencias en la respuesta clínica obtenida con cada protocolo. En cuanto a la respuesta biopatológica tampoco existen diferencias estadísticamente significativas entre las tres pautas, si bien con el empleo del dipropionato de imidocarb, pese a que los resultados finales son los mismos, el proteinograma y el recuento plaquetario se normalizan más lentamente.

Los protocolos descritos que emplean doxiciclina presentan grandes variaciones, en relación con la dosis empleada y la duración del tratamiento; ésta última parece ser más importante que la dosis o la frecuencia con que se administra el fármaco (Woody y Hoskins, 1991). Las pautas más comúnmente empleadas tienen una duración de, aproximadamente, 7-10 días (Van Heerden e Immelman, 1979; Van Heerden, 1982;

Greene y Harvey, 1984). Sin embargo, recientemente se ha conseguido aislar *E.canis* de perros con ehrlichiosis que habían sido tratados con doxiciclina a dosis de 10 mg/kg/día durante 10 días (Iqbal y Rikihisa, 1994a). Los autores de este trabajo inciden nuevamente en la importancia de la duración del protocolo y consideran, como una alternativa válida, la utilización de este fármaco durante 3 ó más semanas. Así, en casos crónicos severos se ha llegado a administrar doxiciclina durante incluso 8 semanas (Woody y Hoskins, 1991).

En nuestra experiencia una duración de 4 semanas debe ser la mínima a utilizar, en líneas generales, alargándose el protocolo, incluso más tiempo, en aquellos casos que no mejoren de un modo rápido. En los primeros casos que atendimos, no incluidos en este estudio, utilizamos protocolos de menor duración, presentando estos animales recaídas en un breve periodo de tiempo.

El dipropionato de imidocarb suele utilizarse con unos protocolos más homogéneos, si bien se han empleado tanto en una sola inyección (Ogunkoya et al, 1981; Van Heerden y Van Heerden, 1981; Adeyanju y Aliu, 1982) como en dos separadas por un periodo de 15 días (Price y Dolan, 1980). Aunque no hay descritas grandes diferencias entre el empleo de las dos pautas, el porcentaje de perros que, en nuestro estudio, no responden a la administración de dos inyecciones es menor que el obtenido por otros autores que emplean una sola dosis (Adeyanju y Aliu, 1982).

Por último, el protocolo mixto que emplea tanto doxiciclina como dipropionato de imidocarb no aporta ninguna mejoría respecto a las pautas que utilizan un único fármaco. En la práctica este tratamiento mixto se suele emplear en aquellos animales que presentan un cuadro grave con la esperanza de obtener una respuesta más favorable que con otras pautas. Al igual que ocurre con los protocolos simples, hemos controlado perros que no responden al tratamiento cuando se emplea esta pauta mixta; en este sentido, la evolución en estos animales posiblemente no dependa tanto del protocolo

empleado como del estado del paciente siendo, en cualquier caso, el pronóstico desfavorable. En nuestra opinión, deben emplearse protocolos simples para poder tener una alternativa en el caso de que no exista una buena respuesta al mismo.

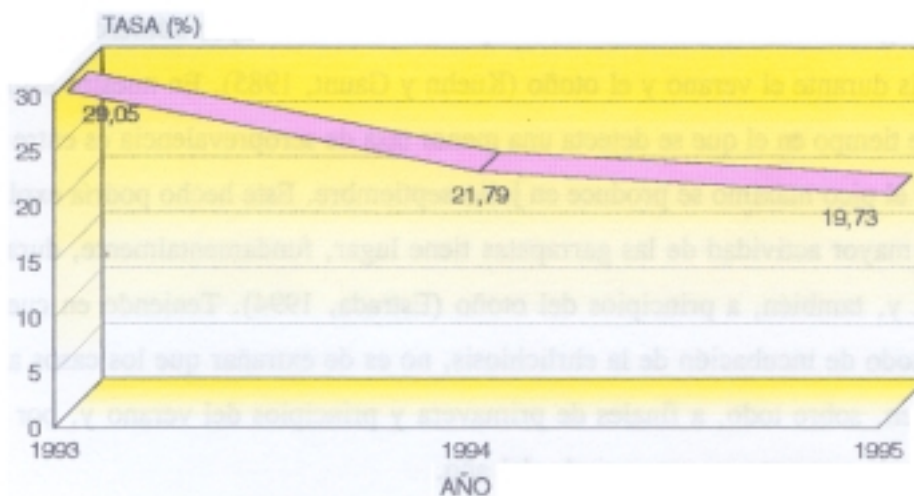
5.4. ESTUDIO EPIZOOTIOLOGICO

5.4.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO

A) Estudio de todos los sueros recibidos en el Servicio de Diagnóstico de ehrlichiosis desde enero de 1993 hasta diciembre de 1995

En primer lugar, aclararemos que la población incluida en este apartado, en principio, es sospechosa de padecer ehrlichiosis, lo cual debe ser tenido en cuenta a la hora de interpretar los resultados. Por ello, como luego veremos, es lógico que el porcentaje de sueros positivos en esta colección sea muy superior al encontrado en el estudio analítico realizado en una población canina al azar.

Fig.50. EVOLUCION SEROPREVALENCIA

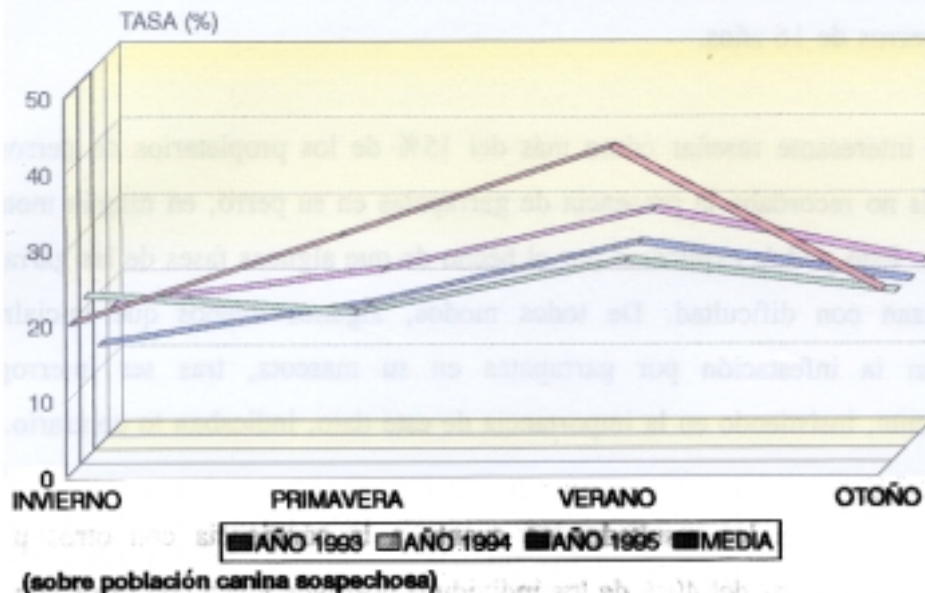


(sobre población canina sospechosa)

La seroprevalencia encontrada nos permite decir que, de cada 5 perros con sospecha de ehrlichiosis, aproximadamente uno es positivo a la técnica de diagnóstico empleada por nosotros. Llama la atención el hecho de que durante el primer año, el porcentaje de sueros positivos sea superior al de los dos años posteriores, existiendo diferencias significativas entre ese primer año y los restantes. Este hallazgo puede estar motivado por diferentes causas. En primer lugar, no se puede descartar el hecho de que realmente la prevalencia de la enfermedad fuera superior en el año 1993. Además existen otros factores que han podido influir en esos datos. Durante este primer año, el número de sueros recibidos fue menor y posiblemente la mayoría de ellos pertenecían a perros con un cuadro típico de ehrlichiosis. Sin embargo, al conocerse poco a poco la frecuente existencia de cuadros inespecíficos en el curso de este proceso, es posible que muchas muestras fueran enviadas simplemente con el fin de realizar un buen diagnóstico diferencial, aún sin tener, en muchos de los casos, una clara sospecha de ehrlichiosis.

En relación con la distribución trimestral de sueros positivos, el curso generalmente crónico de esta enfermedad unido a la existencia de largas fases subclínicas dan lugar a un mantenimiento de la prevalencia durante todo el año. No obstante, algunos autores han detectado la presencia de un mayor número de casos de ehrlichiosis durante el verano y el otoño (Kuehn y Gaunt, 1985). En nuestro estudio el periodo de tiempo en el que se detecta una menor tasa de seroprevalencia es entre enero y marzo y el pico máximo se produce en julio-septiembre. Este hecho podría explicarse porque la mayor actividad de las garrapatas tiene lugar, fundamentalmente, durante la primavera y, también, a principios del otoño (Estrada, 1994). Teniendo en cuenta el breve periodo de incubación de la ehrlichiosis, no es de extrañar que los casos agudos se presenten, sobre todo, a finales de primavera y principios del verano y, por tanto, la prevalencia aumenta en ese periodo del año.

Fig.51. SEROPREVALENCIA ESTACIONAL



Finalmente, hemos incluido la detección de casos seropositivos en diferentes provincias españolas distribuidas, prácticamente, por la totalidad de la geografía nacional. Debido a la frecuente descripción de *R.sanguineus* en España (Cordero del Campillo, 1980; Estrada, 1994), estos datos pueden indicar la existencia de ehrlichiosis en diferentes zonas de España en las que, hasta la fecha, no ha sido descrita.

B) Estudio de diferentes características relacionadas con la epizootiología de la ehrlichiosis en perros diagnosticados de esta enfermedad

Al estudiar la raza de los 171 casos incluidos en este apartado, nos hemos encontrado animales con ehrlichiosis de hasta 31 razas distintas. Los mestizos y los pastores alemanes han sido los más frecuentes si bien no podemos extraer conclusión alguna al respecto puesto que, estas razas, también son las más habituales entre la población canina. De igual modo, debemos reflejar que hemos detectado más casos de ehrlichiosis en machos, probablemente, por el mismo motivo.

En cuanto a la edad de los perros con ehrlichiosis, la distribución de los casos se aproxima a una curva normal, encontrando este proceso desde en cachorros de 1 mes hasta en perros de 16 años.

Es interesante reseñar cómo más del 15% de los propietarios de perros con ehrlichiosis no recordaba la presencia de garrapatas en su perro, en ningún momento de su vida. Esto podría explicarse por el hecho de que algunas fases de las garrapatas se visualizan con dificultad. De todos modos, algunos dueños que inicialmente descartaban la infestación por garrapatas en su mascota, tras ser interrogados repetidamente, insistiendo en la importancia de este dato, indicaban lo contrario.

Si analizamos los resultados en cuanto a la convivencia con otros perros, observaremos que más del 40% de los individuos positivos viven con otros animales; este dato no tendría importancia si no fuera porque, en más de la mitad de estos casos, los perros con los que residían también presentaban ehrlichiosis. Este hecho puede explicarse por la existencia de un hábitat propicio para la presencia de garrapatas común para esos animales o bien por la presencia de perros portadores asintomáticos en el entorno (Groves et al, 1975; Rikihisa, 1991a). Por todo ello, cuando realizamos un diagnóstico de un caso de ehrlichiosis, siempre aconsejamos proceder al control de todos los perros que convivan con el diagnosticado.

En principio puede llamar la atención que más del 40% de los perros con ehrlichiosis vivan normalmente en un piso. Esto podría ser debido al constante movimiento de animales a otras zonas diferentes a la de su residencia habitual. Sin embargo, al estudiar este factor, hemos observado que 27 de los casos vivían en un piso y, además, no habían cambiado nunca de residencia. Teniendo en cuenta que la presencia de *R.sanguineus* en parques públicos de grandes ciudades, como Zaragoza, ya ha sido descrita con anterioridad (Estrada, 1994), debemos pensar que enfermedades

como la ehrlichiosis, transmitidas por este ixódido, pueden darse en perros que vivan en un piso en el centro de una ciudad y que nunca hayan salido al campo.

La aptitud de los perros diagnosticados de ehrlichiosis ha sido muy variada, si bien destaca la predominancia de los perros de compañía frente a los de caza, guarda y pastor. Sin duda, este dato está influenciado por el hábitat de estos animales y, simplemente, puede servirnos para descartar la idea preconcebida de que la ehrlichiosis afecta, preferentemente, a animales con pocos cuidados y que no suelen emplearse como animales de compañía.

La descripción de un mayor número de casos diagnosticados en las zonas norte y este de la Comunidad de Madrid y en el centro urbano puede explicarse simplemente por tratarse de las zonas de mayor influencia de nuestro servicio de diagnóstico, no pudiendo extraer ninguna conclusión en cuanto a la existencia de una mayor prevalencia en unas zonas que en otras; algo similar ocurre en relación al hábitat.

Teniendo en cuenta que los parámetros aquí reseñados han sido sometidos a un estudio descriptivo en perros positivos, con el fin de comprobar si éstos pueden ser considerados factores de riesgo para la presencia de infección, comentaremos, en el siguiente apartado los resultados obtenidos, sobre los mismos parámetros, en una población al azar.

5.4.2. ESTUDIO ANALITICO

La seroprevalencia de la ehrlichiosis canina ha sido estudiada en diferentes áreas geográficas siendo, sin embargo, escasos los datos al respecto en España. Debido al brote epizootológico que se presentó en perros norteamericanos destacados en la guerra del Vietnam, con relativa frecuencia, estos estudios se han llevado a cabo sobre

poblaciones de perros militares (Nims et al, 1971; Keefe et al, 1982; Parzy et al, 1991b).

Las tasas encontradas en la bibliografía son muy variables en función de la población estudiada. En Estados Unidos, la prevalencia de ehrlichiosis en 1982 era mayor en animales pertenecientes a la población civil que en perros militares (Keefe et al, 1982). Sin embargo, los datos encontrados en Senegal en 1987 eran totalmente opuestos (Parzy et al, 1991a). Estos resultados contradictorios podrían explicarse por la existencia de un buen programa profiláctico en los perros militares norteamericanos. De hecho, esto ha sido confirmado en perros del ejército francés en cuya población ha ido disminuyendo la tasa de seroprevalencia a medida que se instauraban diferentes medidas de control (Davoust y Parzy, 1989).

Además de las medidas profilácticas instauradas, lógicamente, también influirá el área geográfica analizada; así, la prevalencia detectada en Senegal, Egipto, Túnez y en otros países africanos ha sido siempre superior al 40% (Parzy et al, 1991a; Parzy et al, 1991b; Brouqui et al, 1991; Botros et al, 1995).

Para algunos autores, más que del área geográfica, estas tasas dependerían de la latitud geográfica (Keefe et al, 1982); en concreto la seroprevalencia encontrada en zonas situadas entre 30 y 45 grados norte (en la que estaría incluida España) sería, aproximadamente, del 13%. Los datos encontrados en territorio francés suelen ser cercanos al 9% (Davoust, 1994).

En una muestra reducida de perros de la zona centro de España, se localizó un 14% de seropositividad frente a *E.canis* (Anda et al, 1990). Los datos encontrados por nosotros nos indican la existencia de una prevalencia de ehrlichiosis canina durante el año 1994 del 6,5%. Este dato no se aleja de los descritos en áreas similares a la estudiada por nosotros. Además, las tasas detectadas en dos zonas concretas de la

Comunidad Autónoma de Madrid (Aranjuez y Navalcarnero), a partir de sueros recogidos en campañas de vacunación, son compatibles con la tasa global hallada en la totalidad del territorio madrileño.

En cuanto a la posible existencia de factores de riesgo, ni la edad ni el sexo pueden ser considerados como tales según nuestro estudio, coincidiendo con los hallazgos encontrados por otros autores en diferentes poblaciones (Nims et al, 1971; Keefe et al, 1982; Botros et al, 1995).

Se ha detectado que el pastor alemán presenta una menor respuesta inmunitaria celular que el Beagle (Nyindo et al, 1980). Este hecho sólo indica que los pastores alemanes que presenten ehrlichiosis pueden, potencialmente, padecer formas más graves, pero no predispone a esta raza a la presentación de la enfermedad. Por ello, no es de extrañar que en nuestro estudio, como en el de otros autores (Keefe et al, 1982), no se detecten diferencias significativas en la existencia de infección en función de la raza.

La presencia de garrapatas, sin embargo, sí es un factor predisponente para la infección por *E. canis* lo cual, en principio, parece bastante lógico; este punto ya ha sido destacado por distintos investigadores (Nims et al, 1971; Botros et al, 1995). En estudios previos realizados por nosotros y no incluidos en este trabajo, detectamos que en una jauría de perros de caza con infestación masiva por garrapatas, localizada en la Comunidad Autónoma de Madrid, la seroprevalencia alcanzaba el 66.7% de los perros estudiados (Sainz et al, 1995). En este mismo estudio en una población de perros policía, localizados en un área próxima pero con un programa profiláctico intensivo que dificultaba la presencia de garrapatas, la prevalencia era del 2.29%. Tales datos sugieren que estas tasas van a depender directamente de la infestación por garrapatas en los perros objeto de estudio.

Factores como el tipo de vivienda o los cambios de residencia no parecen variar la presencia de seropositividad frente a *E.canis*; resultados similares hemos encontrado en cuanto a la aptitud del animal.

La convivencia con animales con ehrlichiosis, a la vista de los resultados del estudio al azar, parece no influir en la seroprevalencia de la misma. Este hallazgo contrasta con el obtenido en el estudio descriptivo de los perros positivos, en el cual la mayoría de ellos residían con otros que también tenían la enfermedad. La diferencia puede estar en que, en el estudio al azar, este dato fue recogido tras encuestar a los dueños pero sin analizar al resto de animales que convivían con el que llegaba a nuestra consulta, por lo que no podemos descartar que alguno de ellos también presentara ehrlichiosis, aunque nunca hubiera sido diagnosticado de la misma.

A pesar de que la seroprevalencia de ehrlichiosis no parece variar de un modo significativo en función de la zona de la Comunidad Autónoma de Madrid estudiada, no ocurre lo mismo en relación al hábitat. Así, los perros que residen en un ambiente periurbano tienen un mayor riesgo de padecer ehrlichiosis. *R.sanguineus*, vector de *E.canis*, parece presentar una especial afinidad por las construcciones que el hombre realiza en zonas en donde este ixódido ya está presente (Estrada, 1994). En este sentido, en las áreas periurbanas, en las que habitualmente existen poblaciones importantes de *R.sanguineus*, se han edificado viviendas en cuyos jardines, perreras y cobertizos fundamentalmente, donde estas garrapatas han encontrado un hábitat ideal (Estrada, 1994).

6. Conclusiones

1ª. Estimamos que el $28.27 \pm 3.4\%$ de los perros con ehrlichiosis presentan concurrencia con otros procesos patológicos entre los que destaca, en nuestra área geográfica, la leishmaniosis canina.

2ª. La sintomatología de la ehrlichiosis canina es muy inespecífica y variada, destacando la aparición de síntomas generales tales como fiebre, adinamia, apatía o pérdida de peso en casi el 80% de los individuos afectados; además, entre un 35 y un 40% de los casos padecen cuadros respiratorios, oftalmológicos, cutáneos o hemorrágicos, y un 25%, sintomatología locomotora o digestiva.

3ª. Entre los síntomas cutáneos de la ehrlichiosis canina destaca la presencia de dermatitis con hiperqueratosis y alopecias, compatibles con reacciones de hipersensibilidad. Estos cuadros aparecen, fundamentalmente, en fases crónicas de la enfermedad.

4ª. Estimamos que los hallazgos más habitualmente encontrados en la analítica sanguínea de perros con ehrlichiosis son trombocitopenia, en el $83.87 \pm 3.81\%$ de los casos, e hiperproteinemia, en el $78.49 \pm 4.26\%$. La leucopenia sólo se observa acompañando a anemia y/o trombocitopenia. Tan sólo el $15.05 \pm 3.71\%$ de los casos presentan pancitopenia.

5ª. La proteinuria es el hallazgo más frecuente en el urianálisis de perros con ehrlichiosis; dicha proteinuria está directamente relacionada con la presentación de hipoalbuminemia.

CONCLUSIONES

6ª. Tanto la doxiciclina como el dipropionato de imidocarb o el empleo conjunto de ambos fármacos en perros con ehrlichiosis canina provocan una mejoría clínica evidente, en la mayoría de los casos en las primeras 72 horas. Estimamos que tan sólo el $6.45 \pm 2.55\%$ de los enfermos no responden al tratamiento y que la respuesta es más lenta cuando la sintomatología es cutánea, tardando ésta en aparecer más de 7 días.

7ª. Si bien con los 3 protocolos empleados, se observa una evolución biopatológica favorable similar, al emplear dipropionato de imidocarb solo, tanto el proteinograma como el recuento plaquetario se normalizan más lentamente.

8ª. El empleo conjunto de doxiciclina y dipropionato de imidocarb no aporta avance alguno respecto del uso de cada uno de estos fármacos por separado.

9ª. La seroprevalencia de ehrlichiosis canina en la Comunidad Autónoma de Madrid, durante 1994, ha sido del $6.50 \pm 1.70\%$.

10ª. Tanto la presencia de garrapatas en el perro como la residencia en un hábitat periurbano son factores de riesgo de infección por *E. canis*, recomendándose el control de los animales que conviven con un seropositivo como medida profiláctica.

11ª. Atendiendo a la distribución estacional de la ehrlichiosis canina, el periodo de tiempo en el que se detecta una menor seroprevalencia es entre enero y marzo mientras que el pico máximo se produce de julio a septiembre.

12ª. Se confirma, serológicamente, la existencia de ehrlichiosis canina en la práctica totalidad del territorio nacional.

7. Resumen

En el presente trabajo se realiza un estudio clínico, biopatológico y terapéutico de perros con ehrlichiosis canina. Se ha comparado la eficacia terapéutica de tres protocolos diferentes: doxiciclina (10 mg/kg/día, por vía oral, durante 28 días), dipropionato de imidocarb (2 dosis de 5mg/kg con un intervalo de 14 días entre ambas, por vía subcutánea) y el empleo conjunto de ambos fármacos. Además, se presenta un estudio epizootológico llevado a cabo en perros de la Comunidad Autónoma de Madrid.

Según los resultados obtenidos, el 28.27% de los perros con ehrlichiosis, de nuestra área geográfica, presentan concurrencias con otros procesos como, fundamentalmente, la leishmaniosis.

Tan sólo un 8,18% de los perros estudiados no presentaban sintomatología clínica. Esta es muy variada, destacando la aparición de síntomas generales tales como fiebre, adinamia, apatía o pérdida de peso en el 78.95% de los individuos afectados. Además, destaca la existencia de cuadros respiratorios (39.18%), cutáneos (38.01%), oftalmológicos (36.84%), hemorrágicos (35.67%), digestivos (26.90%) y locomotores (24.56%). Los cuadros cutáneos, casi inéditos en la bibliografía consultada, suelen cursar con dermatitis con hiperqueratosis y alopecias; habitualmente aparecen en fases crónicas de la enfermedad, pudiendo ser causados por reacciones de hipersensibilidad.

En la analítica sanguínea destaca la trombocitopenia, en el 83.87% de los casos, e hiperproteinemia, en un 78.49%. No se ha detectado ningún caso de leucopenia que no se acompañe de trombocitopenia y/o de anemia. Únicamente en el 15.05% de los casos estudiados se observa pancitopenia.

RESUMEN

En el urianálisis, el hallazgo más importante es la proteinuria (en un 46.24% de los casos), la cual está íntimamente relacionada con la presentación de hipoalbuminemia.

En cuanto al estudio de la eficacia terapéutica, no hemos encontrado grandes diferencias en la respuesta clínica y biopatológica entre los tres protocolos estudiados. Con el empleo de dipropionato de imidocarb, pese a que finalmente se obtienen resultados similares a los encontrados al utilizar los otros dos tratamientos, tanto el proteinograma como el recuento plaquetario se normalizan más lentamente. La mejoría clínica se observa habitualmente a las 24-72 horas; en los casos con síntomas cutáneos esta respuesta suele aparecer a partir de los 7 días. Con independencia del protocolo, sólo el 6.45% de los individuos tratados, no evolucionan favorablemente.

El estudio epizootiológico realizado en 1994 a partir de 200 sueros muestra una seroprevalencia de ehrlichiosis canina, en la Comunidad Autónoma de Madrid, del $6.50 \pm 1.70\%$, utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta. El análisis de diferentes factores de riesgo ha confirmado la influencia, sobre la infección por *E. canis*, de la presencia de garrapatas y de la residencia en un hábitat periurbano. El diagnóstico de ehrlichiosis en diferentes perros de un mismo dueño nos sugiere que el control de aquellos animales que conviven con uno enfermo puede ser una buena medida para la detección de portadores asintomáticos.

En relación con la distribución trimestral de los casos positivos, entre 1993 y 1995, la seroprevalencia fue máxima en el periodo que transcurre de julio a septiembre, con un mínimo entre enero y marzo.

Por último y gracias al diagnóstico serológico de ehrlichiosis en diferentes provincias españolas, se confirma la existencia de esta enfermedad en la práctica totalidad del territorio nacional.

8. *Summary*

In this work we carry out a clinical, biopathologic and therapeutical study of canine ehrlichiosis. We have compared the therapeutical effectiveness of three different protocols: doxycycline (10 mg/kg PO, 28 days), imidocarb dipropionate (5 mg/kg SC, twice at 14-day interval) and doxycycline and imidocarb dipropionate both together. We have also undertaken an epizootologic study of this disease in dogs from the Comunidad Autónoma de Madrid (CAM).

According to our data, 28.27% of the dogs from the CAM are concurrently affected by other diseases, essentially leishmaniasis.

Only 8.18% of the dogs were asymptomatic. We have found a great variety of symptoms: non-specific clinical signs, such as fever, adinamia, apathy and weight loss (in 78.95% of the affected dogs), respiratory signs (in 39.18%), ophthalmologic signs (in 39.18%), haemorrhagic signs (in 35.67%), gastrointestinal signs (in 26.90%) and locomotive signs (in 24.56%). Cutaneous signs have been seldom found in the bibliography consulted. In our experience these signs are, mostly, dermatitis with hyperkeratosis and alopecia; they usually appear in chronic stages of the disease, possibly caused by hypersensitivity reactions.

Thrombocytopenia (83.87%) and hyperproteinemia (78.49%) are the most frequent laboratory findings. Leucopenia goes always with thrombocytopenia and/or anemia. Just 15.05% of the cases show pancytopenia.

Proteinuria, which is closely connected with hypoalbuminemia, is the most relevant finding in the urianalysis.

SUMMARY

Clinical and biopathologic responses have been similar using three different therapeutical protocols, although time to obtain normal values of platelets count and serum protein levels is prolonged with imidocarb dipropionate.

Usually, patients show some improvement within 24-72 hours. When cutaneous signs are present a good response is achieved after 7 days under treatment. Among all treated dogs, only 6.45% got worse during or after therapy.

The epizootiologic study carried out by us, during 1994 from 200 sera reveals that the seroprevalence of canine ehrlichiosis in the CAM is $6.50 \pm 1.70\%$.

Moreover, our data confirm the influence of different risk factors, such as presence of ticks and residence in a suburb, in contracting canine ehrlichiosis. The diagnosis of this disease among different dogs of the same owner suggests that the control of animals living with affected dogs could be a good measure for detecting asymptomatic carriers.

In relation to the quarterly distribution of positive cases, from 1993 to 1995, the maximum seroprevalence occurred between July and September and the minimum between January and March.

Finally, serologic diagnosis of ehrlichiosis in several spanish provinces confirms the presence of this disease within almost all of Spain.

9. Iconografía



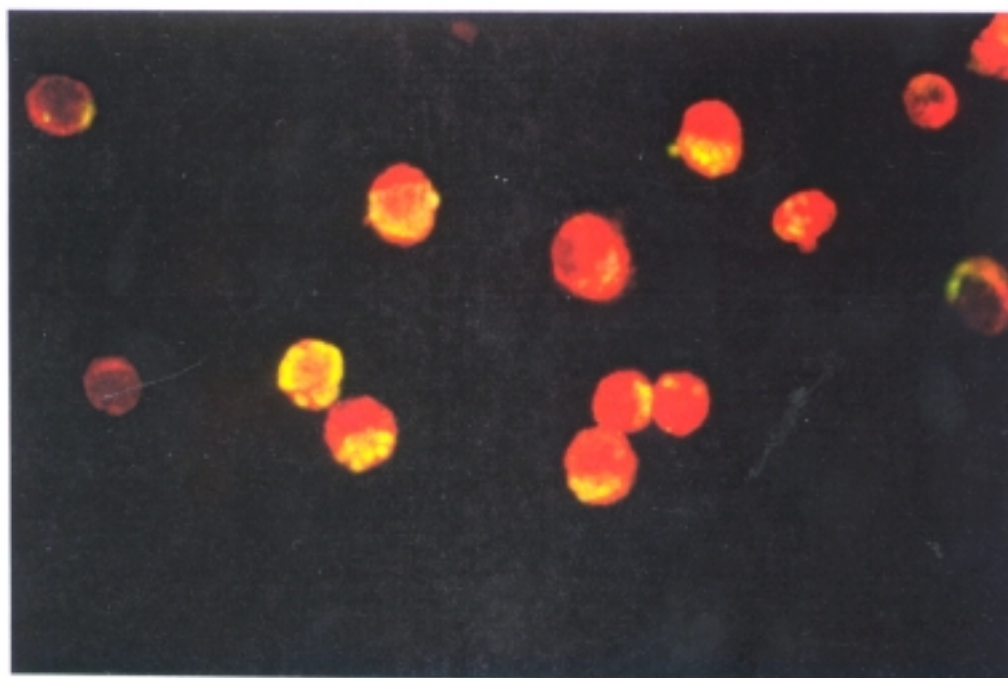
1. Epistaxis unilateral.



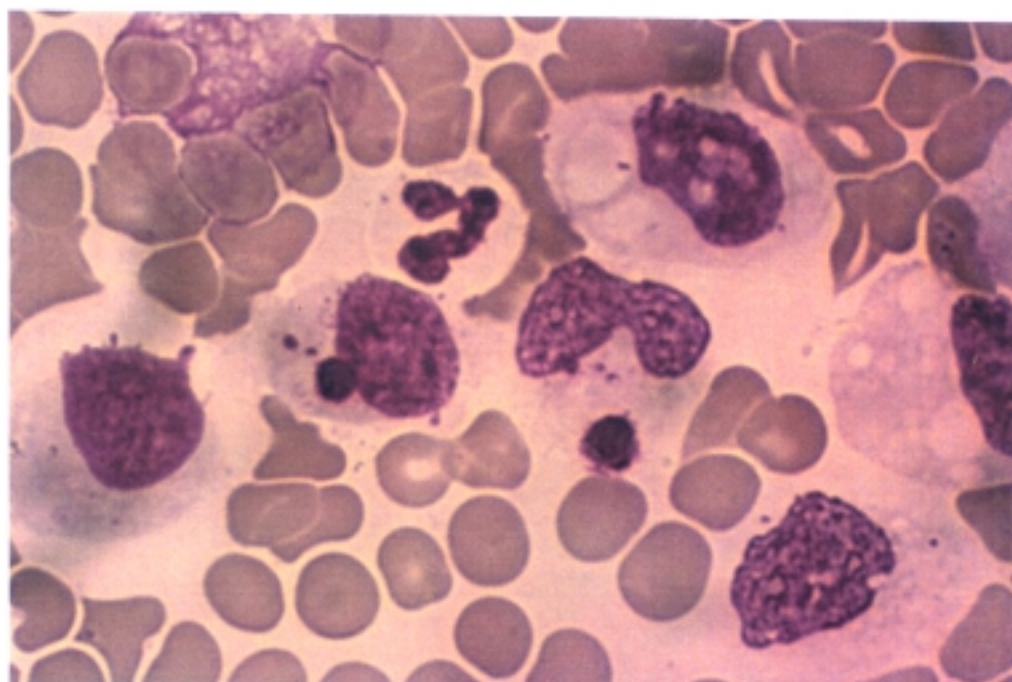
2. Blefaroconjuntivitis purulenta.



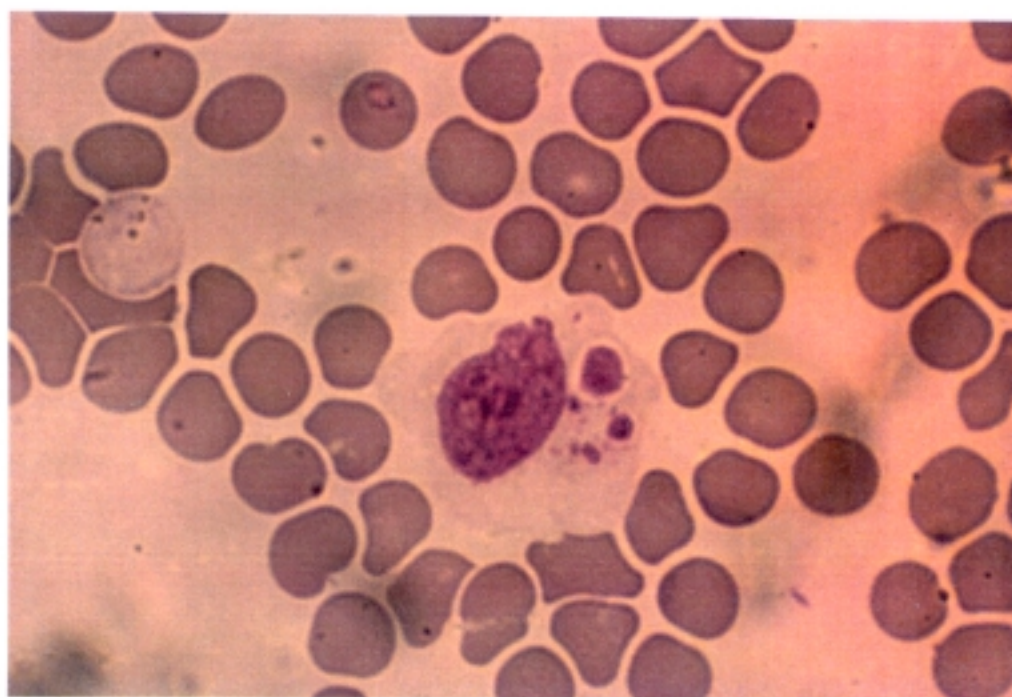
3. Pequeña úlcera en la trufa.



4. IFI positiva a *E.canis*.



5. Mórulas y cuerpos elementales de *E.canis* en el interior de dos células mononucleares (1000x).



6. Mórulas y cuerpos elementales de *E.canis* en una célula mononuclear. Eritrocito parasitado por *Babesia* spp (1000x).



7. Petequias, equimosis y hematomas en región abdominal.



8. Dermatitis en región inguinal.

10. Bibliografía

- Abbott K.C., Vukelja S.J., Smith C.E., McAllister C.K., Konkol K.A., O'Rourke T.J., Holland C.J., Ristic M. (1991). Hemophagocytic syndrome: a cause of pancytopenia in human ehrlichiosis. *American Journal of Hematology*, 38, 230-234.
- Abranches P., Santos-Gomes G., Rachamin N., Lampino L., Schnur L.F., Jaffe C.J. (1991). An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 13, 537-550.
- Adams I.G., Corrier D.E., Williams J.D. (1980). A study of the toxicity of imidocarb in cattle. *Research in Veterinary Science*, 28, 172-177.
- Adawa D.A.Y., Hassan A.Z., Abdullah S.U., Ogunkoya A.B., Adeyanju J.B., Okoro J.E. (1992). Clinical trial of long-acting oxytetracycline and piroxicam in the treatment of canine ehrlichiosis. *Veterinary Quarterly*, 15, 118-120.
- Adeyanju B.J., Aliu Y.O. (1982). Chemotherapy of canine ehrlichiosis and babesiosis with imidocarb dipropionate. *Journal of American Animal Hospital Association*, 18, 827-830.
- Amela C., Méndez I., Torcal J.M., Medina G., Pachón I., Cañavate C., Alvar J. (1995). Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *European Journal of Epidemiology*, 11, 1-5.
- Amyx H.L., Huxsoll D.L., Zeiler D.C., Hildebrant P.K. (1971). Therapeutic and prophylactic value of tetracycline in dogs infected with the agent of tropical canine pancytopenia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 159, 1428-1432.
- Amyx H.L., Huxsoll D.L. (1973). Red and grey foxes: potential reservoir hosts for *Ehrlichia canis*. *Journal of Wildlife Diseases*, 2, 47.
- Anda P., Loma A., Fernández M.V., Ubierna I., Benítez T. (1990). Infecciones por *Ehrlichia canis*. Estudio serológico en perros y pacientes humanos. Proc. IV Congreso SEIMC. D 3/11. Madrid.
- Anderson B.E., Dawson J.E., Jones D.C., Wilson K.H. (1991). *Ehrlichia chaffeensis*, a new specie associated with human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 2838-2842.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson B.E., Sumner J.W., Dawson J.E., Tzianabos T., Greene C.R., Olson J.G., Fishbein D.B., Olsen-Rasmussen M., Holloway B.P., George E.H., Azad A.F. (1992a). Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polimerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 775-780.
- Anderson B.E., Greene C.E., Jones D.C., Dawson J.E. (1992b). *Ehrlichia ewingii* sp.nov., the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 299-302.
- Anderson B.E., Sims K.G., Olson J.G., Childs J.E., Piesman J.F., Happ C.M., Maupin G.O., Johnson B.J.B. (1993). *Amblyomma americanum*: a potential vector of human ehrlichiosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49, 239-244.
- Andreasen C.B. (1988). Neurologic manifestations of ehrlichiosis in a dog. *Modern Veterinary Practice*, 69, 96-97.
- Anziani D.S., Ewing S.A., Barker R.W. (1990). Experimental transmission of a granulocytic form of the tribe *Ehrlichieae* by *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma americanum*. *American Journal of Veterinary Research*, 51, 929-931.
- Baker D.C., Gaunt S.D., Babin S.S. (1988). Anemia of inflammation in dogs infected with *Ehrlichia platys*. *American Journal of Veterinary Research*, 49, 7, 1014-1016.
- Baker D.C., Simpson M., Gaunt S.D., Corstvet R.E. (1987). Acute *Ehrlichia platys* infection in the dog. *Veterinary Pathology*, 24, 449-453.
- Bakken J.S., Dumler J.S., Chen S.M., Eckman M.R., Van Etta L.L., Walker D.H. (1994). Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? *Journal of American Medical Association*, 272, 212-218.
- Barton C.L., Russo E.A., Craig T.M. (1985). Canine hepatozoonosis: a retrospective study of 15 naturally occurring cases. *Journal of American Animal Hospital Association*, 21, 125-134.
- Beaufile J.P., Legroux J.P. (1992). Présence simultanée d'*Ehrlichia* sp. et d'*Hepatozoon canis* dans des granulocytes de chien: a propos de 2 cas. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, 27, 81-86.
- Beaufile J.P., Martin-Granel J., Jumelle P. (1995a). Diagnostic cytologique des ehrlichioses canines. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, 30, 189-195.

- Beaufile J.P., Martin-Granel J., Jumelle P. (1995b). Infection du chat par une *Ehrlichia* sp.: à propos de trois cas. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, 30, 397-402.
- Bellah J., Shull R.M., Selcer E.V.S. (1986). *Ehrlichia canis*-related polyarthritis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 189, 922-923.
- Bezuidenhout J.D., Paterson C.L., Barnard B.J.H. (1985). *In vitro* cultivation of *Cowdria ruminantium*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 52, 113-120.
- Bezuidenhout J.D. (1987). Natural transmission of heartwater. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 54, 349-351.
- Bonnard P., Drazek F. (1990). Cas clinique: pancytopenie canine. *Le Point Vétérinaire*, 22, 129-134.
- Bool P.H., Suttmöller P. (1957). *Ehrlichia canis* infections in dogs on Aruba (Netherlands Antilles). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 130, 418-420.
- Botros B.A.M., Elmolla M.S., Salib A.W., Calamaio C.A., Dasch G.A., Arthur R.R. (1995). Canine ehrlichiosis in Egypt: sero-epidemiological survey. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 62, 41-43.
- Bouloy R.P., Lappin M.R., Holland C.H., Thrall M.A., Baker D., O'Neil S. (1994). Clinical ehrlichiosis in a cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204, 1475-1478.
- Breitschwerdt E.B., Woody B.J., Zerbe C.A., Buyscher E.V.D., Barta O., Buisscher E.V. (1987). Monoclonal gammopathy associated with naturally occurring canine ehrlichiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1, 2-9.
- Breitschwerdt E.B. (1989). Rickettsial disease in dogs: ehrlichiosis and Rocky Mountain spotted fever. *Kal Kan Forum*, 8, 2-7.
- Breitschwerdt E.D., English R.V., Hegarty B.C., Levy M.G., Tompkins W. (1992). Preliminary characterization of a novel infectious cause of thrombocytopenia in dogs (abstract). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 6, 124.
- Breitschwerdt E.B. (1995). The rickettsioses. En: *Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and cat*. Ettinger S.J., Feldman E.C. (ed.) W.B.Saunders. Philadelphia. pp. 376-383.

BIBLIOGRAFIA

- Brouqui P., Davoust B., Haddad S., Vidor E., Raoult D. (1991). Serological evaluation of *Ehrlichia canis* infections in military dogs in Africa and Reunion Island. *Veterinary Microbiology*, 26, 103-105.
- Brouqui P., Raoult D. (1992). In vitro antibiotic susceptibility of the newly recognized agent of ehrlichiosis in humans, *Ehrlichia chaffeensis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 36, 2799-2803.
- Brouqui P., Dumler J.S., Raoult D., Walker D.H. (1992). Antigenic characterization of *Ehrlichieae*: protein immunoblotting of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia sennetsu*, and *Ehrlichia risticii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 1062-1066.
- Brouqui P., Raoult D. (1993). Susceptibilities of *Ehrlichieae* to antibiotics. En: *Antimicrobial agents and intracellular pathogens*. Raoult D.(ed.). CRC Press. Boca Ratón.
- Brouqui P., Birg M.L., Raoult D. (1994). Cytopathic effect, plaque formation, and lysis of *Ehrlichia chaffeensis* grown on continuous cell lines. *Infection and Immunity*, 62, 405-411.
- Buckner R.G., Ewing S.A. (1967). Experimental treatment of canine ehrlichiosis and haemobartonellosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 150, 1524-1530.
- Buhles W.C.Jr., Huxsoll D.L., Ristic M. (1974). Tropical canine pancytopenia: clinical, hematologic, and serologic responses of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. *Journal of Infectious Diseases*, 130, 357-367.
- Buhles W.C., Huxsoll D.L., Hildebrant P.K. (1975). Tropical canine pancytopenia: role of aplastic anemia in the pathogenesis of severe disease. *Journal of Comparative Pathology*, 85, 511-521.
- Buoro I.B.J., Atwell R.B., Kiptoon J.C., Ihiga M.A. (1989). Feline anaemia associated with ehrlichia-like bodies in three short-haired cats. *Veterinary Record*, 125, 434-436.
- Buoro I.B.J., Kanui T.I., Atwell R.B., Njenga K.M., Gathumbi P.K. (1990). Polymyositis associated with *Ehrlichia canis* infection in two dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 31, 624-627.

- Burghen G.A., Beisel W.R., Walker J.S., Nims R.M., Huxsoll D.L., Hildebrandt P.K. (1971). Development of hypergammaglobulinemia in tropical canine pancytopenia. *American Journal of Veterinary Research*, 32, 749-756.
- Bush B.M. (1991). Normal reference ranges. En: Interpretation of laboratory results for small animal clinicians. Bush B.M. (ed.). Blackwell Scientifics Publications. Oxford. pp.478-481.
- Cadman H.F., Kelly P.J., Matthewman L.A., Zhou R., Mason P.R. (1994). Comparison of the dot-blot enzyme linked immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*. *Veterinary Record*, 135, 362.
- Cairó J., Font J., Gorraiz J., Martín N., Pallisera M., Pons C. (1994). Hepatozoonosis canina. Estudio retrospectivo de 8 casos clínicos. *Clínica veterinaria de pequeños animales*, 14, 35-46.
- Campbell R.S.F. (1994). Pathogenesis and pathology of the complex rickettsial infections. *Veterinary Bulletin*, 64, 1, 1-24.
- Capelli J.L., Bohlay P., Barre D. (1994). Carence en folates et vitamine B₁₂ chez un chien infecté par *Ehrlichia canis*. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, 4, 395-402.
- Carrillo J.M., Green R.A. (1978). A case report of canine ehrlichiosis: neutrophilic strain. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 14, 100-104.
- Carter G.B., Seamer J., Snape T. (1971). Diagnosis of tropical canine pancytopenia (*Ehrlichia canis* infection) by immunofluorescence. *Research in Veterinary Science*, 12, 318-322.
- Centers for Disease Control. (1988). Human ehrlichiosis-United States. Morbidity and Mortality Weekly Report, 37, 270-277.
- Centers for Disease Control. (1990). Rocky Mountain spotted fever and human ehrlichiosis-United States, 1989. Morbidity and Mortality Weekly Report, 39, 281-284.
- Centers for Disease Control and Prevention, World Health Organization. (1994). Epi Info 6: a word processing, database and statistics program for public health. U.S.A. y Switzerland.
- Charpentier F., Groulade P. (1986). Un cas d'ehrlichiose probable chez le chat. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire*, 59, 287-290.

BIBLIOGRAFIA

- Chen S.M., Dumler J.S., Bakken J.S., Walker D.H. (1994). Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 589-595.
- Chen S.M., Popov V.L., Feng H.M., Wen J., Walker D.H. (1995). Cultivation of *E. chaffeensis* in mouse embryo, Vero, BGM and L929 cells and study of *Ehrlichia*-induced cytopathic effect and plaque formation. *Infection and Immunity*, 63, 647-655.
- Codner E.C., Roberts R.E., Ainsworth G. (1985). Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 186, 166-169.
- Codner E.C., Farris-Smith L.L. (1986). Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 189, 47-50.
- Codner E.C., Maslin W.R. (1992). Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. *American Journal of Veterinary Research*, 53, 294-299.
- Codner E.C., Caceci T., Saunders G.K., Smith C.A., Robertson J.L., Martin R.A., Troy G.C. (1992). Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. *American Journal of Veterinary Research*, 53, 2286-2291.
- Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach E.M., Strober W. (1992). Antibody detection and preparation. En: *Current protocols in immunology*. John Wiley and Sons. New York, Unit 2.4.
- Coll J.L., Descamps H., Fayette J.P., Feraud J.P., Villemin. (1982). Essai de chimio-prévention de la babesiose canine avec l'imidocarbe. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 158, 791-798.
- Cordero del Campillo M. (1980). Índice-catálogo de zooparásitos ibéricos. Servicio de Publicaciones del Ministerio de Sanidad y Seguridad Social. Madrid, pp.489.
- Couto C.G. (1992). Rickettsial diseases. En: *Essentials of Small Animal Internal Medicine*. Nelson R.W. y Couto C.G.(ed.). Mosby Year Book. St.Louis., pp.960-963.
- Couto C.G. (1994). Rickettsial diseases. En: *Saunders Manual of Small Animal Practice*. Birchard S.J. y Sherding R.G.(ed.). W.B.Saunders. Philadelphia.

- Cowell R.L., Tyler R.D., Clinkenbeard K.D., Meinkoth J.H. (1988). Ehrlichiosis and polyarthritis in three dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 192, 1093-1095.
- Cupp E.W. (1991). Biology of ticks. *Veterinary Clinics of North America*, 21, 1-26.
- Davidson Jr.D.E, Dill G.S., Tingpalapong M., Prembutra S., Nguen P.L., Stephenson E.H., Ristic M. (1978). Prophylactic and therapeutic use of tetracycline during an epizootic of ehrlichiosis among military dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 172, 697-700.
- Davoust B., Parzy D. (1989). Ehrlichiose canine. Surveillance épidémiologique dans les chenils militaires du Sud-Est. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 165, 373-377.
- Davoust B., Parzy D., Vidor E., Hasselot N., Martet G. (1991a). Ehrlichiose canine expérimentale. Étude clinique et thérapeutique. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 167, 33-40.
- Davoust B., Parzy D., Ott D., Hasselot N. (1991b). Ehrlichiose canine chronique: intérêt de la numération plaquettaire. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 142, 287-292.
- Davoust B. (1994). Epidémiologie de l'ehrlichiose, de la leishmaniose et de la dirofilariose canine. A propos de la situation actuelle dans les effectifs de l'armée française. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 145, 249-256.
- Dawson J.E., Fishbein D.B., Eng T.R., Redus M.A., Greene N.R. (1990). Diagnosis of human ehrlichiosis with the indirect fluorescent antibody test: kinetics and specificity. *Journal of Infectious Diseases*, 162, 91-95.
- Dawson J.E., Anderson B.E., Fishbein D.B., Sánchez J.L., Goldsmith C.S., Wilson K.H., Duntley C.W. (1991a). Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 2741-2745.
- Dawson J.E., Rikihisa Y., Ewing S., Fishbein D.B. (1991b). Serologic diagnosis of human ehrlichiosis using two *Ehrlichia canis* isolates. *Journal of Infectious Diseases*, 163, 564-567.
- Dawson J.E., Ewing S.A. (1992). Susceptibility of dogs to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, causative agent of human ehrlichiosis. *American Journal of Veterinary Research*, 53, 1322-1327.

BIBLIOGRAFIA

- Dawson J.E., Candal F.J., George V.G., Ades E.W. (1993). Human endothelial cells as an alternative to DH82 cells for isolation of *Ehrlichia chaffeensis*, *E.canis* and *Rickettsia rickettsii*. *Pathobiology*, 61, 293-296.
- Dawson J.E., Childs J.E., Biggie K.L., Moore C., Stallknecht D.E., Shaddock J., Bouseman J., Hofmeister E., Olson J.G. (1994a). White-tailed deer as a potential reservoir of *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. *Journal of Wildlife Diseases*, 30, 162-168.
- Dawson J.E., Stallknecht D.E., Howerth E.W., Biggie K.L., Davidson W.R., Lockhart J.M., Nettles V.F., Olson J.G., Childs J.E. (1994b). Susceptibility of white tailed deer to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 2725-2728.
- Dimmitt D.C., Fishbein D.B., Dawson J.E. (1989). Human ehrlichiosis associated with cerebrospinal fluid pleocytosis: a case report. *American Journal of Medicine*, 87, 677-678.
- Donatien A., Lestoquard F. (1935). Existence en Algérie d'une *Rickettsia* du chien. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 28, 418-419.
- Donatien A., Lestoquard F. (1936). Recherches sur *Rickettsia canis* comparaison avec *Rickettsia conorii*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 29, 1052-1056.
- Donatien A., Lestoquard F. (1937). Etat actuel des connaissances sur les rickettsioses animales. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*, 15, 148-187.
- Dumler J.S., Brouqui P., Aronson J., Taylor J.P., Walker D.H. (1991). Identification of ehrlichia in human tissue. *New England Journal of Medicine*, 325, 1109-1110.
- Dumler J.S., Walker D.H. (1991). Human ehrlichiosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 4, 597-602.
- Dumler J.S., Sutker W.L., Walker D.H. (1993a). Persistent infection with *Ehrlichia chaffeensis*. *Clinical Infectious Diseases*, 17, 903-905.
- Dumler J.S., Dawson J.E., Walker D.H. (1993b). Human ehrlichiosis: hematopathology and immunohistologic detection of *Ehrlichia chaffeensis*. *Human Pathology*, 24, 391-396.

- Dunn B.E., Monson T.P., Dumler J.S., Morris C.C., Westbrook A.B., Duncan J.L., Dawson J.E., Sims K.G., Anderson B.E. (1992). Identification of *Ehrlichia chaffeensis* morulae in cerebrospinal fluid mononuclear cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 2207-2210.
- Du Plessis J.L. (1970). Pathogenesis of heartwater. I. *Cowdria ruminantium* in the lymph nodes of domestic ruminants. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 37, 89-96.
- Du Plessis J.L., Fourie N., Nel P.W., Evezard D.N. (1990). Concurrent babesiosis and ehrlichiosis in the dog: blood smear examination supplemented by the indirect fluorescent antibody test, using *Cowdria ruminantium* as antigen. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 57, 151-155.
- Elias E., Homans P.A. (1988). *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical and haematological findings; treatment. *Journal of Small Animal Practice*, 29, 55-62.
- Elias E. (1991). Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E.canis*. *Journal of Small Animal Practice*, 33, 540-543.
- Ellett E.W., Playter R.F., Pierce K.R. (1973). Retinal lesions associated with induced canine ehrlichiosis: a preliminary report. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 9, 214-218.
- Eng T.R., Giles R. (1989). Ehrlichiosis-zoonosis update. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 194, 497-500.
- Eng T.R., Harkess J.R., Fishbein D.B., Dawson J.E., Green C.N., Redus M.A., Satalowich F.T. (1990) Epidemiologic, clinical and laboratory findings of human ehrlichiosis in the United States, 1988. *Journal of the American Medical Association*, 264, 2251-2258.
- Estrada A. (1994). Las garrapatas en España: introducción. Consejería de Sanidad y Bienestar Social. Junta de Castilla y León (ed.). Valladolid.
- Euzéby J., Moreau Y., Chauve C., Gevrey J., Gauthey M. (1980). Expérimentation des propriétés antipiroplasmiques de l'imidocarb sur *Babesia canis*, agent de la piroplasmose canine en Europe. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 53, 475-480.
- Ewing S.A. (1963). Observations on leukocytic inclusion bodies from dogs infected with *Babesia canis*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 143, 503-506.

BIBLIOGRAFIA

- Ewing S.A., Buckner R.G., Stringer B.G. (1964). The coyote, a potential host for *Babesia canis* and *Ehrlichia* species. *Journal of Parasitology*, 50, 704.
- Ewing S.A., Buckner R.G. (1965a). Manifestations of babesiosis, ehrlichiosis and combined infection in the dog. *American Journal of Veterinary Research*, 26, 815-828.
- Ewing S.A., Buckner R.G. (1965b). Observations on the incubation period and persistence of *Ehrlichia* sp. in experimentally infected dogs. *Veterinary Medicine*, 60, 152-155.
- Ewing S.A. (1969). Canine ehrlichiosis. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. 13, 331-353.
- Ewing S.A., Roberson W.R., Buckner R.G., Hayat C.S. (1971). A new strain of *Ehrlichia canis*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 159, 12, 1771-1774.
- Fishbein D.B., Sawyer L.A., Holland C.J., Hayes E.B., Okoroanyanwu W., Williams D., Sikes R.K., Ristic M., McDade J.E. (1987). Unexplained febrile illnesses after exposure to ticks. Infection with an *Ehrlichia*? *Journal of the American Medical Association*, 257, 3100-3104.
- Fishbein D.B., Kemp A., Dawson J.E., Greene N.R., Redus M.A., Fields D.H. (1989). Human ehrlichiosis: prospective active surveillance in febrile hospitalized patients. *Journal of Infectious Diseases*, 160, 803-809.
- Fishbein D.B. (1990). Human ehrlichiosis in the United States. En: *Ehrlichiosis: a vector-borne disease of animals and humans*. Williams J.C. y Kakoma I.(ed.). Kluwer Academic Publishers, 100-111.
- Fishbein D.B., Dawson J.E., Robinson L.E. (1994). Human ehrlichiosis in the United States, 1985 to 1990. *Annals of Internal Medicine*, 120, 736-743.
- Font J., Cairó J., Callés A. (1988). Ehrlichiosis canina. *Revista de AVEPA*, 8: 141-148.
- French T.W., Harvey J.W. (1983). Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. *American Journal of Veterinary Research*, 44, 2407-2411.
- French A. (1988). Canine Ehrlichiosis. *Veterinary Annual*, 196-201.

- Garris G.I. (1991). Control of ticks. *Veterinary Clinics of North America*, 21, 173-183.
- Gaunt S.D., Baker D.C., Babin S.S. (1990). Platelet aggregation in dogs with acute *Ehrlichia platys* infection. *American Journal of Veterinary Research*, 51, 2, 290-293.
- Gelatt K.N. (1991). Canine anterior uvea. En: *Veterinary Ophthalmology*. Gelatt K.N. (ed.). Lea & Febiger. Philadelphia, pp.374-375.
- Ghorbel A., Cadoré J.L., Clerc B., Bouattour A., Vidor E., Sayn M.J. (1993a). L'efficacité de l'oxytétracycline dans le traitement de l'ehrlichiose canine. *Revue Médecine Vétérinaire*, 144, 109-114.
- Ghorbel A., Clerc B., Cadoré J.L., Djaeim A., Sayn M.J. (1993b). Ehrlichiose asymptomatique: étude de l'électrophorèse des protéines sériques. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 169, 561-566.
- Gilbert S., Clercx C., Henroteaux M. (1992). L'ehrlichiose canine. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 136, 505-510.
- Glaze M.B., Gaunt S.D. (1986). Uveitis associated with *Ehrlichia platys* infection in a dog. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 188, 9, 916-917.
- Gorham J.R., Foreyt W.J. (1984). Salmon poisoning disease. En: *Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat*. C.E.Greene (ed.). W.B.Saunders. Philadelphia.
- Gossett K.A., Gaunt S.D., Aja D.S. (1985). Hepatozoonosis and ehrlichiosis in a dog. *Journal of American Animal Hospital Association*, 21, 265-267.
- Greene C.E., Harvey J.W. (1984). Canine ehrlichiosis. En: *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the dog and cat*. C.E.Greene (ed.). W.B.Saunders. Philadelphia. pp.704-709.
- Greene C.E., Burgdorfer W., Cavagnolo R., Philip R.N., Peacock M.G. (1985). Rocky Mountain spotted fever in dogs and its differentiation from canine ehrlichiosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 186, 465-472.
- Greene C.E. (1986). Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis. En: *Current Veterinary Therapy VIII*. R.W.Kirk (ed.). W.B.Saunders. Philadelphia. pp.1080-1084.

BIBLIOGRAFIA

- Greene R.T. (1995). Canine ehrlichiosis: clinical implications for humoral factors. En: Kirk's Current Veterinary Therapy XII. Small Animal Practice. Bonagura (ed). W.B.Saunders. Philadelphia. pp.290-293.
- Gregson J.D. (1967). Observations on the movement of fluids in the vicinity of the mouth parts of naturally feeding *Dermacentor andersoni* stiles. Parasitology, 57, 1-8.
- Greig A., McLeod N.S.M., Allison J. (1977). Tick borne fever in association with mucosal disease and cobalt deficiency in calves. Veterinary Record, 100, 562-564.
- Gribble D.H. (1969). Equine ehrlichiosis. Journal of American Veterinary Medical Association, 155, 462-469.
- Groves M.G., Dennis G.L., Amyx H.L., Huxsoll D.L. (1975). Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). American Journal of Veterinary Research, 36, 7, 937-940.
- Guerrero A., Fishbein D.B., Mesa E., Escudero R. (1991). ¿Infección humana por *Ehrlichia canis* en España? Medicina Clínica (Barcelona), 96, 236-237.
- Guerrero A. (1993). Ehrlichiosis humana. Enfermedades Infecciosas. Microbiología clínica, 1, 271-276.
- Harkess J.R. (1989). Ehrlichiosis: a cause of bone marrow hypoplasia in humans (letter). American Journal of Hematology, 30, 265-266.
- Harkess J.R., Ewing S.A., Crutcher J.M., Kudlac J., McKee G., Istre G.R. (1989). Human ehrlichiosis in Oklahoma. Journal of Infectious Diseases, 159, 576-579.
- Harkess J.R. (1991). Ehrlichiosis. Infectious Diseases Clinics of North America, 5, 37-51.
- Harkess J.R., Ewing S.A., Brumit T., Mettry C.R. (1991). Ehrlichiosis in children. Pediatrics, 87, 199-203.
- Harvey J.W., Simpson C.F., Gaskin J.M. (1978). Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. Journal of Infectious Diseases, 137, 182-188.
- Harvey J.W., Simpson C.F., Gaskin J.M., Samwek J.H. (1979). Ehrlichiosis in wolves, dogs and wolf-dog crosses. Journal of the American Veterinary Medical Association, 175, 901-905.

- Harvey J.W. (1990). *Ehrlichia platys* infection (infectious cyclic thrombocytopenia of dogs). En: Infectious diseases of the dog and cat. C.E.Greene (ed.). W.B.Saunders, Philadelphia. pp.415-417.
- Heald R.D. (1984). *Ehrlichia*-associated Coombs'-positive anemia in a dog. Canine Practice, 11, 34-36.
- Hemelt I.E., Lewis G.E., Huxsoll D.L., Stephenson E.H. (1980). Serial propagation of *Ehrlichia canis* in primary canine peripheral blood monocyte cultures. Cornell Vet., 70, 37-42.
- Herrero C., Pelaz C., Alvar J., Molina R., Vázquez J., Anda P., Casal J., Martin-Bourgon C. (1992). Evidence of the presence of spotted fever group rickettsiae in dogs and dog ticks of the central provinces in Spain. European Journal of Epidemiology, 8, 575-579.
- Hibler S.C., Hoskins J.D., Greene C.E. (1986). Rickettsial infections in dogs: part II. Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia. Compendium Continuing Education Practice Veterinary, 8, 106-114.
- Hildebrant P.K., Conroy J.D., McKee A.E. (1973a). Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. Infection and Immunity, 7, 265-271.
- Hildebrant P.K., Huxsoll D.L., Walker J.S., Nims R.M., Taylor R., Andrews M. (1973b). Pathology of canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia). American Journal of Veterinary Research, 34, 1309-1320.
- Hoilien G.A., Ristic M., Huxsoll D.L., Rapmund G. (1982). *Rickettsia sennetsu* in human blood monocytes cultures: similarities to the growth cycle of *Ehrlichia canis*. Infection and Immunity, 35, 314-319.
- Holland C.J., Ristic M., Huxsoll D.L., Cole A.I., Rapmund G. (1985a). Adaptation of *Ehrlichia sennetsu* to canine blood monocytes: preliminary structural and serological studies with cell culture-derived *Ehrlichia sennetsu*. Infect.Immun., 48, 366-371.
- Holland C.J., Weiss E., Burgdorfer W., Cole A.I., Kakoma I. (1985b). *Ehrlichia risticii* sp.nov.: etiological agent of equine monocytic ehrlichiosis (synonym Potomac horse fever). Int.J.Syst.Bacteriol., 35, 524-526.
- Holland C.J., Ristic M. (1991). Development of a cell line for continuous in vitro propagation of *Ehrlichia canis*. In: *Rickettsiae and rickettsial diseases*. Proceedings of the IVth International Symposium on Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Kazar J., Raoult D. (ed.). Piestany Spa.Czech and Slovak Federal Republics, 771-775.

BIBLIOGRAFIA

- Horus Hardware (1987). SIGMA.
- Hoskins J.D., Barta O., Rothschnitt J. (1983). Serum hyperviscosity syndrome associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. Journal of the American Veterinary Medical Association, 183, 1011-1012.
- Hoskins J.D., Cupp E.W. (1983). Ticks of veterinary importance. Part I. The Ixodidae family: identification, behavior, and associated diseases. Compendium Continuing Education Practice Veterinary, 10, 564-580.
- Hoskins J.D., Breitschwerdt E.B., Gaunt S.D., French T.W., Burgdorfer W. (1988). Antibodies to *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia platys* and spotted fever group rickettsiae in Louisiana dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2, 55-59.
- Hoskins J.D. (1991). The brown dog tick. Veterinary Clinics of North America, 21, 99-101.
- Hribernik T. (1981). Canine ehrlichiosis. Compendium Continuing Education Practice Veterinary, 3, 997-1004.
- Huber W.G. (1977). Tetracyclines. En: Veterinary pharmacology and therapeutics. L.M.Jones (ed.). Iowa State University Press. Ames.
- Huxsoll D.L., Hildebrant P.K., Nims R.M., Ferguson J.A., Walker J.S. (1969). *Ehrlichia canis*-the causative agent of a hemorrhagic disease of dogs? Veterinary Record, 85, 587.
- Huxsoll D.L., Hildebrant P.K., Nims R.M., Amyx H.L., Ferguson J.A. (1970a). Epizootiology of tropical canine pancytopenia. Journal of Wildlife Diseases, 6, 220-225.
- Huxsoll D.L., Hildebrant P.K., Nims R.M., Walker J.S. (1970b). Tropical canine pancytopenia. Journal of the American Veterinary Medical Association, 157, 1627-1632.
- Huxsoll D.L., Amyx H.L., Hemelt I.E., Hildebrant P.K., Nims R.M., Gochenour Jr, W.S. (1972). Laboratory studies of tropical canine pancytopenia. Experimental Parasitology, 31, 53-59.
- Huxsoll D.L. (1975). Canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia): a review. Veterinary Parasitology, 2, 49-60.

- Huxsoll D.L. (1990). The historical background and global importance of ehrlichiosis. En: Ehrlichiosis. A vector-borne disease of animals and man. Williams J.C., Kakoma I.(ed.). Kluwer Academic Publishers. pp. 1-8.

- Iqbal Z., Chaichanasiriwithaya W., Rikihisa Y. (1994). Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. Journal of Clinical Microbiology, 32, 1658-1662.

- Iqbal Z., Rikihisa Y. (1994a). Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. Journal of Clinical Microbiology, 32, 1644-1649.

- Iqbal Z., Rikihisa Y. (1994b). Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissues of dogs. Veterinary Microbiology, 42, 281-287.

- Johansson K.E., Pettersson B., Uhlén M., Gunnarsson A., Malmqvist M., Olsson E. (1995). Identification of the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in swedish dogs and horses by direct solid phase sequencing of PCR products from the 16S rRNA gene. Research in Veterinary Research, 58, 109-112.

- Juste R.A., Scott G.R., Paxton E.A., Gelabert J.L., Jiménez S. (1989). Presence of *Cytoecetes phagocytophila* in an atypical disease of cattle in Spain. Veterinary Record, 124, 636.

- Kakoma I., Carson C.A., Ristic M., Huxsoll D.L., Stephenson E.H., Nyindo M.B.A. (1977). Autologous lymphocyte-mediated cytotoxicity against monocytes in canine ehrlichiosis. American Journal of Veterinary Research, 38, 1557-1559.

- Kakoma I., Carson C.A., Ristic M., Stephenson E.H., Hildebrant P.K., Huxsoll D.L. (1978). Platelet migration inhibition as an indicator of immunologically mediated target cell injury in canine ehrlichiosis. Infection and Immunity, 20, 242-247.

- Kakoma I., Carson C.A., Ristic M. (1980). Direct and indirect lymphocyte participation in the immunity and immunopathology of tropical canine pancytopenia-a review. Comp.Immun.Microbiol. Infect.Dis., 3, 291-298.

- Kakoma I., Hansen R.D., Anderson B.E., Hanley T.A., Sims K.G., Liu L., Bellamy C., Long M.T., Baek B.K. (1994). Cultural, molecular and immunological characterization of the etiologic agent for atypical canine ehrlichiosis. Journal of Clinical Microbiology, 32, 1, 170-175.

- Keefe T., Holland C., Salyer P.E., Ristic M. (1982). Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. J.A.V.M.A., 181, 236-238.

BIBLIOGRAFIA

- Kelly P.J., Matthewman L.A., Mahan S.M., Semu S., Peter T., Mason P.R., Brouqui P., Raoult D. (1994a). Serological evidence for antigenic relationship between *Ehrlichia canis* and *Cowdria ruminantium*. *Research in Veterinary Science*, 56, 170-174.
- Kelly P.J., Carter S.D., Bobade P.A., Matthewman L.A., Bell S.C. (1994b) Absence of antinuclear antibodies in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Record*, 134, 382.
- Klag A.R., Dunbar L.E., Girard C.A. (1991). Concurrent ehrlichiosis and babesiosis in a dog. *Canadian Veterinary Journal*, 32, 305-307.
- Kontos V.I., Papadoulos O., French T.W. (1991). Natural and experimental canine infections with a greek strain of *Ehrlichia plarys*. *Vet. Clin. Pathol.*, 20, 101-108.
- Kuehn N.F., Gaunt S.D. (1985). Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 186, 355-358.
- Kuttler K.L. (1980). Pharmacotherapeutics of drugs used in treatment of anaplasmosis and babesiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 176, 1103-1108.
- Larsen H.J.S., Overnes G., Waldeland H., Johansen G.M. (1994). Immunosuppression in sheep experimentally infected with *Ehrlichia phagocytophila*. *Research in Veterinary Science*, 56, 216-224.
- Lewis G.E., Huxsoll D.L., Ristic M., Johnson A.J. (1975). Experimentally induced infection of dogs, cats and nonhumans primates with *Ehrlichia equi*, etiologic agent of equine ehrlichiosis. *American Journal of Veterinary Research*, 36, 85-88.
- Lewis G.E., Ristic M., Smith R.D., Lincoln T., Stephenson E.H. (1977). The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. *American Journal of Veterinary Research*, 38, 12, 1953-1955.
- Lewis G.E., Hill S.L., Ristic M. (1978). Effect of canine immune serum on the growth of *Ehrlichia canis* within nonimmune canine macrophages. *American Journal of Veterinary Research*, 39, 71-76.
- Lewis G.E., Ristic M. (1978). Effect of canine immune macrophages and canine immune serum on the growth of *Ehrlichia canis*. *American Journal of Veterinary Research*, 39, 77-82.

- Lockhart J.M., Davidson W.R., Dawson J.E., Stallknecht J. (1995). Temporal association of *Amblyomma americanum* with the presence of *Ehrlichia chaffeensis* reactive antibodies in white-tailed deer. *Journal of Wildlife Diseases*, 31, 119-124.
- Longhofer S.L. (1988). Chemotherapy of rickettsial, protozoal and chlamydial diseases. *Veterinary Clinics North America. Small Animal Practice*, 18, 1183-1196.
- López J. (1994). Tres enfermedades transmitidas por garrapatas. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales*, 14, 119-128.
- Lovering S.L., Pierce K.R., Adams L.G. (1980). Serum complement and blood platelet adhesiveness in acute canine ehrlichiosis. *American Journal of Veterinary Research*, 41, 1266-1271.
- Luguru S.M., Banda D.S., Pegram R.G. (1984). Susceptibility of ticks to acaricides in Zambia. *Tropical Animal and Health Production*, 16, 21-26.
- Madewell B.R., Gribble D.H. (1982). Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 180, 512-514.
- Madigan J.E. (1987). Questions diagnosis of ehrlichiosis (letter). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 190, 244-245.
- Maeda K., Markowitz N., Hawley R.C., Ristic M., Cox D., McDade J.E. (1987). Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *New England Journal of Medicine*, 316, 853-856.
- Magnarelli L.A., Litwin H.J., Holland C.J., Anderson J.F. y Ristic M. (1990). Canine ehrlichiosis in Connecticut. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 366-367.
- Magnarelli L.A., Anderson J.F. (1993). Serologic evidence of canine and equine ehrlichiosis in Northeastern United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 2857-2860.
- Makinde M.O., Bobade P.A. (1994). Osmotic fragility of erythrocytes in clinically normal dogs and dogs infected with parasites. *Research in Veterinary Science*, 57, 343-348.
- Malherbe W.D. (1948). The diagnosis and treatment of rickettsiosis in dogs. *Journal of South African Veterinary Medical Association*, 19, 135-146.

BIBLIOGRAFIA

- Maretzki C.H., Fisher D.J., Greene C.E. (1994). Granulocytic ehrlichiosis and meningitis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 205, 1554-1556.
- Martinez D., Maillard J.C., Coisne S., Sheikboudou C., Bensaid A. (1994). Protection of goats against heartwater acquired by immunisation with inactivated elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41, 153, 163.
- Matthewman L.A., Kelly P.J., Bobade P.A., Tagwira M., Mason P.R., Majok A., Brouqui P., Raoult D. (1993). Infections with *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in dogs in Zimbabwe. *Veterinary Record*, 133, 344-346.
- Matthewman L.A., Kelly P.J., Mahan S.M., Semu S.M., Mason P.R., Bruce D., Brouqui P., Raoult D. (1994a). Reactivity of sera from dogs in Mutare, Zimbabwe, to antigens of *Ehrlichia canis* and *Cowdria ruminantium*. *Veterinary Record*, 134, 498-499.
- Matthewman L.A., Kelly P.J., Brouqui P., Raoult D. (1994b). Further evidence for the efficacy of imidocarb dipropionate in the treatment of *Ehrlichia canis* infection. *Journal of the South African Veterinary Association*, 65, 104-107.
- Matus R.E., Leifer C.E., Hurvitz A.L. (1987). Use of plasmapheresis and chemotherapy for treatment of monoclonal gammopathy associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 190, 1302-1304.
- McDade J.E. (1990). Ehrlichiosis-a disease of animals and humans. *Journal of Infectious Diseases*, 161, 609-617.
- Meana A., Rupérez C., López P., Miró G. (1993). Estudio epidemiológico de las parasitosis de perros abandonados en la provincia de Madrid. Datos preliminares I: protozoosis. Resúmenes III Congreso Ibérico de Parasitología. Lisboa.
- Meinkoth J.H., Hoover J.P., Cowell R.L., Tyler R.D., Link J. (1989). Ehrlichiosis in a dog with seizures and nonregenerative anemia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 195, 1754-1755.
- Messick J.B., Rikihisa Y. (1992). Suppression of Ia antigen expression on gamma interferon treated macrophages infected with *Ehrlichia risticii*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 32, 225-241.

- Messick J.B., Rikihisa Y. (1993). Characterization of *Ehrlichia risticii* binding, internalization and proliferation in host cells by flow cytometry. *Infection and Immunity*, 61, 9, 3803-3810.
- Misao T., Kobayashi Y. (1955). Studies on infectious mononucleosis (glandular fever). Isolation of etiologic agent from blood, bone marrow and lymph node of patients with infectious mononucleosis using mice. *Kiushu J.Med.Sci.*, 6, 145-152.
- Morais D., Dawson J.E., Greene C., Filipe A.R., Galhardas L.C., Bacellar F (1991). First european case of ehrlichiosis. *Lancet*, 338, 633-634.
- Moreland K.J., Wilson E.A., Simpson R.B. (1990). Concurrent *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infections in a Texas dog. *Journal of American Animal Hospital Association*, 26, 635-639.
- Moscovitz M., Faden R., Min T. (1991). Human ehrlichiosis: a rickettsial disease associated with severe cholestasis and multisystemic disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 13, 86-90.
- Newton B.Z. (1967). Interaction of berenil with deoxyribonucleic acid and some characteristics of the berenil- deoxyribonucleic acid complex. *Biochemistry Journal*, 105, 50-51.
- Nims R.M., Ferguson J.A., Walker J.S., Hildebrandt P.K., Huxsoll D.L., Reardon M.J., Varley J.E., Kolaja G.J., Watson W.T., Shroyer E.L., Elwell P.A., Vacura G.W. (1971). Epizootiology of tropical canine pancytopenia in Southeast Asia. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 158, 53-63.
- Nuñez-Torrón J., Recuna M., Amusatogui I. (1996). Babesiosis canina: aspectos clínicos. *Veterinaria en Madrid*, 33, 32-35.
- Nyindo M., Ristic M., Huxsoll D.L., Smith A.R. (1971). Tropical canine pancytopenia: in vitro cultivation of the causative agent-*Ehrlichia canis*. *American Journal of Veterinary Research*, 32, 1651.
- Nyindo M., Huxsoll D.L., Ristic M., Kakoma I., Brown J.L., Carson C.A., Stephenson E.H. (1980). Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. *American Journal of Veterinary Research*, 41, 250-254.
- Nyindo M., Kakoma I., Hansen R. (1991). Antigenic analysis of four species of the genus *Ehrlichia* by use of protein immunoblot. *American Journal of Veterinary Research*, 52, 1225-1230.

BIBLIOGRAFIA

- Ogunkoya A.B., Adeyanju J.B., Aliu Y.O. (1981). Experiences with use of Imizol in treating canine blood parasites in Nigeria. *Journal of Small Animal Practice*, 22, 775-777.
- Olmeda S., Martín R., Rupérez C., Badiola C., Montes C., Miró G. (1993). Estudio epidemiológico de las parasitosis de perros abandonados en la provincia de Madrid. Datos preliminares. III: ectoparasitosis. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 1, 218.
- Oteo J.A., Martínez de Artola V., Eiros J.M. (1995). Ehrlichiosis humana en España. Algunas consideraciones epidemiológicas. *Enfermedades Infecciosas. Microbiología Clínica*, 13, 265.
- Paddock C.D., Suchard D.P., Grumbach K.L., Hadley W.K., Kerschmann R.L., Abbey N.W., Dawson J.E., Anderson B.E., Sims K.G., Dumler J.S., Herndier B.G. (1993). Brief report: fatal seronegative ehrlichiosis in a patient with HIV infection. *New England Journal of Medicine*, 329, 1164-1167.
- Palmer J.E. (1989). Prevention of Potomac horse fever. *Cornell Veter.*, 79, 201-205.
- Parzy D., Davoust B., Raphenon G., Vidor E. (1991a). L'ehrlichiose canine au Senegal: enquête séroépidémiologique humaine et canine à Dakar. *Medecine Tropicale*, 51, 61-63.
- Parzy D., Davoust B., Haddad S., Vidor E., Lecamus J.L. (1991b). Seroprevalence de l'ehrlichiose humaine et canine. Etude en milieu militaire dans le nord tunisien. *Médecine et Armées*, 19, 215-219.
- Pearce C.J., Conrad M.E., Nolan P.E., Fishbein D.B., Dawson J.E. (1988). Ehrlichiosis: a cause of bone marrow hypoplasia in humans. *American Journal of Hematology*, 28, 53-55.
- Pennisi, M.G. (1989). Ehrliquisis canina. *Animalis familiaris*, 4, 1, 11-16.
- Perille A.L., Matus R.E. (1991). Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 5, 195-198.
- Petersen L.R., Sawyer L.A., Fishbein D.B., Kelley P.K., Thomas R.J., Magnarelli L.A., Redus M., Dawson J.E. (1989). An outbreak of ehrlichiosis in members of an Army Reserve unit exposed to ticks. *Journal of Infectious Diseases*, 159, 562-568.
- Philip C.B., Hadlow W.J., Hughes L.E. (1954). Studies on salmon poisoning disease of canines. 1. The rickettsial relationships and pathogenicity of *Neorickettsia helminthoeca*. *Experimental Parasitology*, 3, 336-350.

- Pierce K.R., Marrs G.E., Hightower D. (1977). Acute canine ehrlichiosis: platelet survival and factor 3 assay. *American Journal of Veterinary Research*, 38, 1821-1825.
- Pretzman C., Ralph D., Stothard D.R., Fuerst P.A., Rikihisa Y. (1995). 16S rRNA gene sequence of *Neorickettsia helminthoeca* and its phylogenetic alignment with members of the genus *Ehrlichia*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 207-211.
- Price J.E., Dolan T.T. (1980). A comparison of the efficacy of imidocarb dipropionate and tetracycline hydrochloride in the treatment of canine ehrlichiosis. *Veterinary Record*, 107, 275-277.
- Price J.E., Karstad L.H. (1980). Free-living jackals (*Canis mesomelas*)-potential reservoir hosts for *Ehrlichia canis* in Kenya. *Journal of Wildlife Disease*, 16, 469-473.
- Price J.E., Sayer P.D., Dolan T.T. (1987). Improved clinical approach to the diagnosis of canine ehrlichiosis. *Tropical Animal Health and Production in Afrika*, 19, 1-8.
- Pyle R.L. (1980). Canine ehrlichiosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 177, 1197.
- Reardon M.J., Pierce K.R. (1981). Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. *Veterinary Pathology*, 18, 48-61.
- Reflotrón®. (1990). Sistema Reflotrón®. Valores de referencia en sangre. Perro, gato, caballo. Información Comercial. Boehringer Mannheim. AGPOgraf (ed.). Barcelona.
- Rikihisa Y. (1991a). The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 4, 3, 286-308.
- Rikihisa Y. (1991b). Cross-reacting antigens between *Neorickettsia helminthoeca* and *Ehrlichia* species, shown by immunofluorescence and Western immunoblotting. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 2024-2029.
- Rikihisa Y., Ewing S.A., Fox J.C., Siregar A.G., Pasaribu F.H., Malole M.B. (1992). Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic *Ehrlichia* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 143-148.
- Ristic M., Huxsoll D.L., Weisiger R.M., Hildebrant P.K., Nyindo M.B.A. (1972). Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescent. *Infection and Immunity*, 6, 226-231.

BIBLIOGRAFIA

- Ristic M. (1976). Tick-borne rickettsias of veterinary importance with emphasis on the immunology of the disease. En: Tick-borne diseases and their vectors. Wilde J.K.H.(ed.). Edinburgh University Press. Edinburgh. pp.475-481.
- Ristic M., Huxsoll D.L., Tachibana N., Rapmund G. (1981). Evidence of a serologic relationship between *Ehrlichia canis* and *Rickettsia sennetsu*. American Journal Tropical Medicine and Hygiene, 30, 1324-1328.
- Ristic M., Huxsoll D.L. (1984). Ehrlichieae. En: Kreig N.R., Holt J.G., eds. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins, pp. 704-709.
- Ristic M., Holland C.J., Dawson J.E. (1986). Diagnosis of equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever) by indirect immunofluorescence. Journal of American Veterinary Medical Association, 189, 39-46.
- Ristic M., Boothe D. (1987). Diagnosis of infections with *Ehrlichia* agents with emphasis on canine ehrlichiosis. Journal of American Veterinary Medical Association, 190, 1604.
- Ristic M., Dawson J., Holland C.J., Jenny A. (1988). Susceptibility of dogs to infection with *Ehrlichia risticii*, causative agent of equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever). American Journal of Veterinary Research, 49, 9, 1497-1500.
- Ristic M. (1990). Current strategies in research on ehrlichiosis. En: Williams J.C., Kakoma I.(ed.). Ehrlichiosis: a vector-borne disease of animals and humans. Kluwer Academic Publishers. pp.136-153.
- Ristic M., Holland C.J., Khondowe M. (1991). An overview of research on ehrlichiosis. En: Rickettsiae and rickettsial diseases. Proceedings of the IVth International Symposium on Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Kazar J., Raoult D. (ed.). Piestany Spa.Czech and Slovak Federal Republics, pp.733-739.
- Rodríguez J.A. (1993). Aspectos da luta contra os carrapatos em Espanha, com discriminação dos principais métodos, das respectivas drogas e sua eficácia. Proceed. II S.I.S.I.E.T. Evora (Portugal).
- Rodríguez J.F. (1990). Dirofilariosis canina y otras parasitosis filariales. Incidencia, diagnóstico, tratamiento y prevención. Clínica Veterinaria de Pequeños Animales, 10, 91-111.

- Rohrbach B.W., Harkess J.R., Ewing S.A., Kudlac J., McKee G.L., Istre G.R. (1990). Epidemiologic and clinical characteristics of persons with serologic evidence of *E.canis* infection. American Journal of Public Health, 80, 442-445.
- Sagredo P., Fraile C., Sainz A., Rupérez C., Tesouro M., González J.L. (1994). Skin lesions associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. Proceed. 11th annual Congress European Society of Veterinary Dermatology. Bordeaux.
- Sainz A., Tesouro M.A., Rodríguez F., Mayoral I., Mazzucchelli F. (1995). Seroprevalence of *Ehrlichia canis* infections in police dogs in Spain. Preventive Veterinary Medicine, 23, 179-182.
- Saz J.V., Dawson J.E., Bacellar F., Merino F.J., Filipe A.R. (1994). A propósito de la ehrlichiosis humana en España. Enfermedades Infecciosas. Microbiología Clínica, 12, 357-358.
- Schaer M., Meyer D.J., Young D.G. (1985). A dual infection of *Leishmania donovani* and *Ehrlichia canis* in a dog. Compendium on Continuing Education, 7, 531-534.
- Schalm O.W., Jain N.C., Carroll E.J. (1975). Normal values in blood morphology with comments on species characteristics in response to disease. En: Veterinary Hematology. Schalm O.W., Jain N.C., Carroll E.J.(ed.). Lea & Febiger. Philadelphia. pp. 82-218.
- Seamer J., Snape T. (1972). *Ehrlichia canis* and tropical canine pancytopenia. Research in Veterinary Science, 13, 307-314.
- Segura F. (1994). Ehrlichiosis humana. Consideraciones epidemiológicas. Enfermedades Infecciosas. Microbiología Clínica, 12, 323-324.
- Shankarappa B., Dutta S.K., Mattingly-Napier B.L. (1992). Antigenic and genomic relatedness among *Ehrlichia risticii*, *Ehrlichia sennetsu*, and *Ehrlichia canis*. International Journal of Systematic Bacteriology, 42, 1, 127-132.
- Shaw D.H., Rubin S.I. (1986). Pharmacologic activity of doxycycline. Journal of American Veterinary Medical Association, 189, 808-809.
- Simpson C.F. (1972). Structure of *Ehrlichia canis* in blood monocytes of a dog. American Journal of Veterinary Research, 33, 2451-2454.

BIBLIOGRAFIA

- Simpson T.M., Gaunt S.D., Hair J.A., Kocan K.M., Henk W.G., Casey H.W. (1991). Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. American Journal of Veterinary Research, 52, 9, 1537-1541.
- Smith R.D., Hooks J.E., Huxsoll D.L., Ristic M. (1974). Canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia): survival of Phosphorus-32-labeled blood platelets in normal and infected dogs. American Journal of Veterinary Research, 35, 269-273.
- Smith R.D., Ristic M., Huxsoll D.L., Baylor R.A. (1975). Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. Infection and Immunity, 11, 1216-1221.
- Smith R.D., Sells D.M., Stephenson E.H., Ristic M., Huxsoll D.L. (1976). Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic rickettsia. American Journal of Veterinary Research, 37, 2, 119-126.
- Smith R.D., Ristic M. (1977). *Ehrlichia*. En: Parasitic Protozoa IV. Kreier (ed.). New York. pp.295-328.
- Stephenson E.H., Osterman J.V. (1977). Canine peritoneal macrophages: cultivation and infection with *Ehrlichia canis*. American Journal of Veterinary Research, 38, 1815-1819.
- Stephenson E.H., Osterman J.V. (1980). Somatic cell hybrids of canine peritoneal macrophages and SV40-transformed human cells: derivation, characterization and infection with *Ehrlichia canis*. American Journal of Veterinary Research, 41, 234-240.
- Stockham S.L., Schmidt D.A., Tyler J.W. (1985). Canine granulocytic ehrlichiosis in dogs from Central Missouri: a possible cause of polyarthritis. Vet.Med.Rev., 6, 3-5.
- Tachibana (1986). Sennetsu fever: the disease, diagnosis, and treatment. En: Leive L.(ed.). Microbiology. Washington. pp.205-208.
- Taylor J.P., Betz T.G., Fishbein D.B., Roberts M.A., Dawson J., Ristic M. (1988). Serological evidence of possible human infection with *Ehrlichia* in Texas. Journal of Infectious Diseases, 158, 217-220.
- Tesouro M.A. (1984). Aspectos clínicos y laboratoriales de la leishmaniosis canina. Estudio epizootológico en la provincia de Madrid. Tesis doctoral. Madrid.

- Tesouro M.A., Sainz A., Mayoral I., Rodríguez F. (1993). Concurrencia de ehrlichiosis canina con otras enfermedades hemáticas. Proceed. II SISIET. Evora (Portugal).
- Theis J.H., Budwiser P.D. (1974). *Rhipicephalus sanguineus*: sequential histopathology at the host-arthropod interface. *Experimental Parasitology*, 36, 77-105.
- Troy G.C., Vulgamott J.C., Turnwald G.H. (1980). Canine ehrlichiosis: a retrospective study of 30 naturally occurring cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 16, 181-187.
- Troy G.C., Forrester S.D. (1990). *Ehrlichia canis*, *E. equi*, and *E. risticii* infections. En: *Infectious diseases of the dog and cat*. C.E. Greene (ed.). W.B. Saunders. Philadelphia. pp.404-414.
- Tuomi J., von Bonsdorff C.H. (1966). Electron microscopy of tick-borne fever agent in bovine and ovine phagocytizing leukocytes. *Journal of Bacteriology*, 92, 1478-1492.
- Tvedten H. (1994). Erythrocyte disorders. En: *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods*. Willard M.D., Tvedten H., Turnwald G.H. (ed.). W.B. Saunders. Philadelphia. pp.31-51.
- Uhaa I.J., MacLean J.D., Greene C.R., Fishbein D.B. (1992). A case of human ehrlichiosis acquired in Mali: clinical and laboratory findings. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46, 161-164.
- Uilenberg G., Dobbelaere D.A.E., Gee A.L.W., Koch H.T. (1993). Progress in research on tick-borne diseases: theileriosis and heartwater. *Veterinary Quarterly*, 15, 48-54.
- Van Heerden J., Immelman A. (1979). The use of doxycycline in the treatment of canine ehrlichiosis. *Journal of South African Veterinary Association*, 50, 241-244.
- Van Heerden J., Goosen J. (1981). Attempted transmission of canine ehrlichiosis to the vervet monkey. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 48, 127-128.
- Van Heerden J., Van Heerden A. (1981). Attempted treatment of canine ehrlichiosis with imidocarb dipropionate. *Journal of South African Veterinary Association*, 52, 173-175.
- Van Heerden J. (1982). A retrospective study on 120 natural cases of canine ehrlichiosis. *Journal South African Veterinary Association*, 53, 17-20.

BIBLIOGRAFIA

- Villemain P., Dubor M., Bellangeon M., Fremont Y., Fayette J.P. (1984). Activité de l'imidocarb contre différentes protozooses et rickettsioses du chien et du chat. *Revue Médecine Vétérinaire*, 135, 441-448.
- Vliet A.H.M., Jongejan F., Zeijst B.A.M. (1992). Phylogenetic position of *Cowdria ruminantium* (Rickettsiales) determined by analysis of amplified 16S ribosomal DNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 494-498.
- Waddle J.R., Littman M.P. (1988). A retrospective study of 27 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis. *Journal of American Animal Hospital Association*, 24, 615-620.
- Walker J.S., Rundquist J.D., Taylor R., Wilson B.L., Andrews M.R., Barck J., Hogge A.L., Huxsoll D.L., Hildebrandt P.K., Nims R.M. (1970). Clinical and clinicopathologic findings in tropical canine pancytopenia. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 157, 43-55
- Weiser M.G., Thrall M.A., Fulton R., Beck E.R., Wise L.A., Van Steenhouse J.L. (1991). Granular lymphocytosis and hyperproteinemia in dogs with chronic ehrlichiosis. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 27, 84-88.
- Weisiger R.M., Ristic M., Huxsoll D.L. (1975). Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method. *American Journal of Veterinary Research*, 36, 689-694.
- Weiss E., Dasch G.A. (1981). The Family Rickettsiaceae: pathogens of domestic animals and invertebrates; nonpathogenic arthropod symbiotes. En: *The Prokaryotes*. Starr M.P. Springer-Verlag. Berlin. pp. 2161-2171.
- Weiss E., Moulder J.M. (1984). Order I. *Rickettsiales*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol.1. N.R.Krieg (ed.). Williams & Wilkins Co. Baltimore. pp. 687-704.
- Weiss E., Dasch G.A., Kang Y-H. (1985). Glutamine metabolism of *Ehrlichia sennetsu*. En: *Rickettsiae and rickettsial diseases*. Kazar J. Slovak Academy of Science. Bratislava. pp. 38-45.
- Weiss E., Dasch G.A., Kang Y-H., Westfall H.N. (1988). Substrate utilization by *Ehrlichia sennetsu* and *Ehrlichia risticii* separated from host constituents by Renografin gradient centrifugation. *Journal of Bacteriology*, 170, 5012-5017.
- Weiss E., Williams J.C., Dasch G.A., Kang Y-H. (1989). Energy metabolism of monocytic *Ehrlichia*. *Proc. National Academy Sciences USA*. 86, 1674-1678.

- Weiss E., Dasch G.A., Williams J.C., Kang Y-H. (1990). Biological properties of the genus *Ehrlichia*: substrate utilization and energy metabolism. En: Ehrlichiosis: a vector-borne disease of animals and humans. Williams J.C., Kakoma I. Kluwer Academic Publishers. Boston. pp. 59-67.
- Wells M.Y., Rikihisa Y. (1988). Lack of lysosomal fusion with phagosomes containing *Ehrlichia risticii* in P388D1 cells: abrogation of inhibition with oxytetracycline. *Infection and Immunity*, 56, 3209-3215.
- Wen B., Rikihisa Y., Mott J., Fuerst P.A., Kawahara M., Sutto Ch. (1995). *Ehrlichia muris* sp.nov., identified on the basis of 16S rRNA base sequences and serological, morphological and biological characteristics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 250-254.
- Wilkins J.H., Bowden R.S.T., Wilkinson G.T. (1967). A new canine disease syndrome. *Veterinary Record*, 81, 57-58.
- Wilkins R.J., Hurwitz A.I., Dodds-Laffin W.J. (1973). Immunologically mediated thrombocytopenia in the dog. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 163, 277-282.
- Willder A.G. (1977). Prophylactic use of tetracycline for tropical canine pancytopenia. *Veterinary Record*, 101, 15.
- Wilson J.F. (1992). *Ehrlichia platys* in a Michigan dog. *Journal of American Animal Hospital Association*, 28, 381-383.
- Winjum N., Riley L.K. (1993). In vitro proliferation of canine granulocytic *Ehrlichia*. *Veterinary Microbiology*, 34, 355-362.
- Winkler G.C., Arnold P., Deplazes P., Glardon O., Lutz H. (1988). Klinische und serologische diagnose von ehrlichiose bei hunden in der Schweiz. *Schweiz.Arch.Tierheilk*, 130, 357-367.
- Woody B.J., Hoskins J.D. (1991). Ehrlichial diseases of dogs. *Veterinary Clinics of North America*, 21, 1, 75-98.
- Yu X., Brouqui P., Dumler J.S., Raoult D. (1993). Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in human tissue by using a species-specific monoclonal antibody. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 3284-3288.

